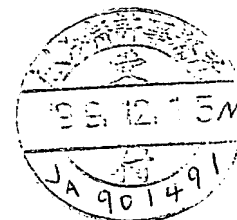


特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号  
高愛ビル 9階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
[PCT規則44.1]

発送日

(日.月.年)

14.12.99

出願人又は代理人  
の書類記号

JA901491

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/05916

国際出願日

(日.月.年)

26.10.99

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

### 3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

#### 〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

#### 〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。



次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

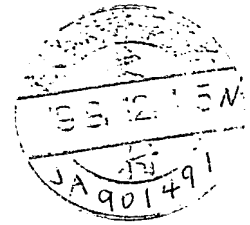




P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕



出願人又は代理人 の書類記号 JA901491	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 5 9 1 6	国際出願日 (日.月.年) 26. 10. 99	優先日 (日.月.年) 26. 10. 98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 1 8 条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/GenBank/EMBL/DDBJ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Database BIOSIS on DIALOG, BIOSIS No. 19900377627, Shimada T., et al. "IKK-i, a novel lipopolysaccharide- inducible kinase that is related to IkappaB kinases", abstract, (International Immunology(1999. Aug), Vol. 11, No. 8, p. 1357-1362)	1-8
A	Nagase T., et al. "Prediction of the coding sequences of unid entified human genes", DNA Res. (1995), Vol. 2, p. 167-174, Table 1及び3のKIAA0151遺伝子参照	1-8
A	US, 5776717, A (Tularik Inc.) 7. 7月. 1998 (07. 07. 98) 請求項 1 及び第 15 - 18 欄参照 & WO, 98/39410, A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 12. 99

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ebrahim Z., et al. "The I $\kappa$ B kinase complex(IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$ and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation", Cell(1997), Vol. 91, No. 2, P. 243-252	1-8
A	Joseph A., et al. "A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B", Nature(1997), Vol. 288, No. 6642, p. 548-554	1-8
A	Frank Mercurio et al. "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation", Science(1997), Vol. 278, p. 860-866	1-8
A	John D., et al. "I $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ and NIK", Science(1997), Vol. 278, p. 866-8869	1-8
A	Catherine H., et al. "Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase", Cell(1997), Vol. 90, No. 2, P. 373-383	1-8



特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	受理 登録入欄
国際出願日	
(受付印)	24 JUN 2000
出願人又は代理人の登録記号 (希望する場合、最大12字)	J A 9 0 1 4 9 1

第 I 欄 発明の名称

I K K - i キナーゼの新たな基質 I - T R A F の同定

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken

332-0012 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

048-226-5619

ファクシミリ番号:

048-226-5652

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国について出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

審良 静男 AKIRA Shizuo

〒562-0031 日本国大阪府箕面市小野原東6-17-18-202

6-17-18-202, Onohara-higashi, Minoo-shi, Osaka-fu

562-0031 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国について出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

電話番号:

03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電信番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。





## 第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

嶋田 高広 SHIMADA Takahiro

〒592-0013 日本国大阪府高石市取石 5 丁目 4 - 1 8

Toriishi 5-chome  
4-18, ~~5-chome, Toriishi~~, Takaishi-shi, Osaka-fu  
592-0013 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



## 第V欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと； 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

## 広域特許

- ☐ AP ARIPO特許：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ EA ユーラシア特許：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ特許：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ OA OAPI 特許：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャド Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                       | <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia  |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania                                       | <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho   |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia                                       | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria                                      | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia                                   | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar   |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados                                      | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria                                      | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil   | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus                                       | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada                               | <input type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway   |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China  | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba   | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic                                 | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany   | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark                                       | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia                                       | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain  | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland                                      | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom                                   | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada  | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia  | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana   | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia                                       | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary                                       | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia                                    | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel  | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> IN インド India   | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland                                      | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan                                 | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya   | <input type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan                                     | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea           |   |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea                                |   |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan                                   |   |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka                                    |   |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を待たずして通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)



## 第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先 の 出 願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : * 広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 26.10.98	平成10年特許願 第304085号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

\* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日. 月. 年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / JP

## 第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 4 枚  
 明細書（配列表を除く）..... 24 枚  
 請求の範囲 ..... 1 枚  
 要約書 ..... 1 枚  
 図面 ..... 13 枚  
 明細書の配列表 ..... 8 枚  
 合 計 ..... 51 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙  
☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面  
☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面  
2. ☒ 別紙の記名押印された委任状  
3. ☐ 包括委任状の写し  
4. ☐ 記名押印（署名）の説明書  
5. ☐ 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）  
6. ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）  
7. ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面  
8. ☐ エクストラクト又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）  
9. ☒ その他（書類名を詳細に記載する）
- ・ 陳述書  
 ・ フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

## 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



## 受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された

ISA / JP

6. ☐

調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日



P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 1 4 9 1

受理官庁の日付印

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）  
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T+S

3. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 51 枚

最初の30枚まで

54,800 円 b1

21 × 1,300 =

27,300 円 b2

30枚を越える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

82,100 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 4

4 × 12,600 =

50,400 円 D

支払うべき指定手数料  
の数（上限は10）  
（注4）

1指定当たりの手数料  
（円）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

132,500 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

227,500 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

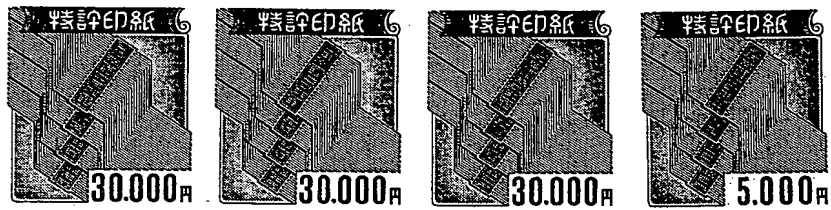
（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した口の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、10指定以上は一律10とする。







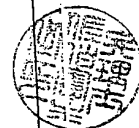
送付手数料・調査手数料 95,000円



# ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日		時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき廻町
111026		13.55	022	0022	0632671	
お取引内容	お取引金額	お取扱いで きない場合	残高	お取扱金額		
お振込	¥132,500*			*** 2円 *** 5円 *** 10円 *** 50円 *** 100円 *** 500円 ***		
ご案内 お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様 ご依頼人 タクミトツキヨシムシヨ サエキ ノリオ 様 0352052521 税込手数料 210円 をご利用口座からいただきました						



カード1枚でご預金のお出し入れ、お立替のご利用ができます。  
**東京三菱のマイカード**



- 残高欄の金額は決済未遂の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



**東京三菱銀行**

基本手数料	82,100円
指定手数料	50,400円
合 計	132,500円



JA 92121

# 委任状

1999年10月6日

私儀、弁理士 佐伯 憲生氏を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「IKK-キナーゼの新たな基質 I-TRAF の同定」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

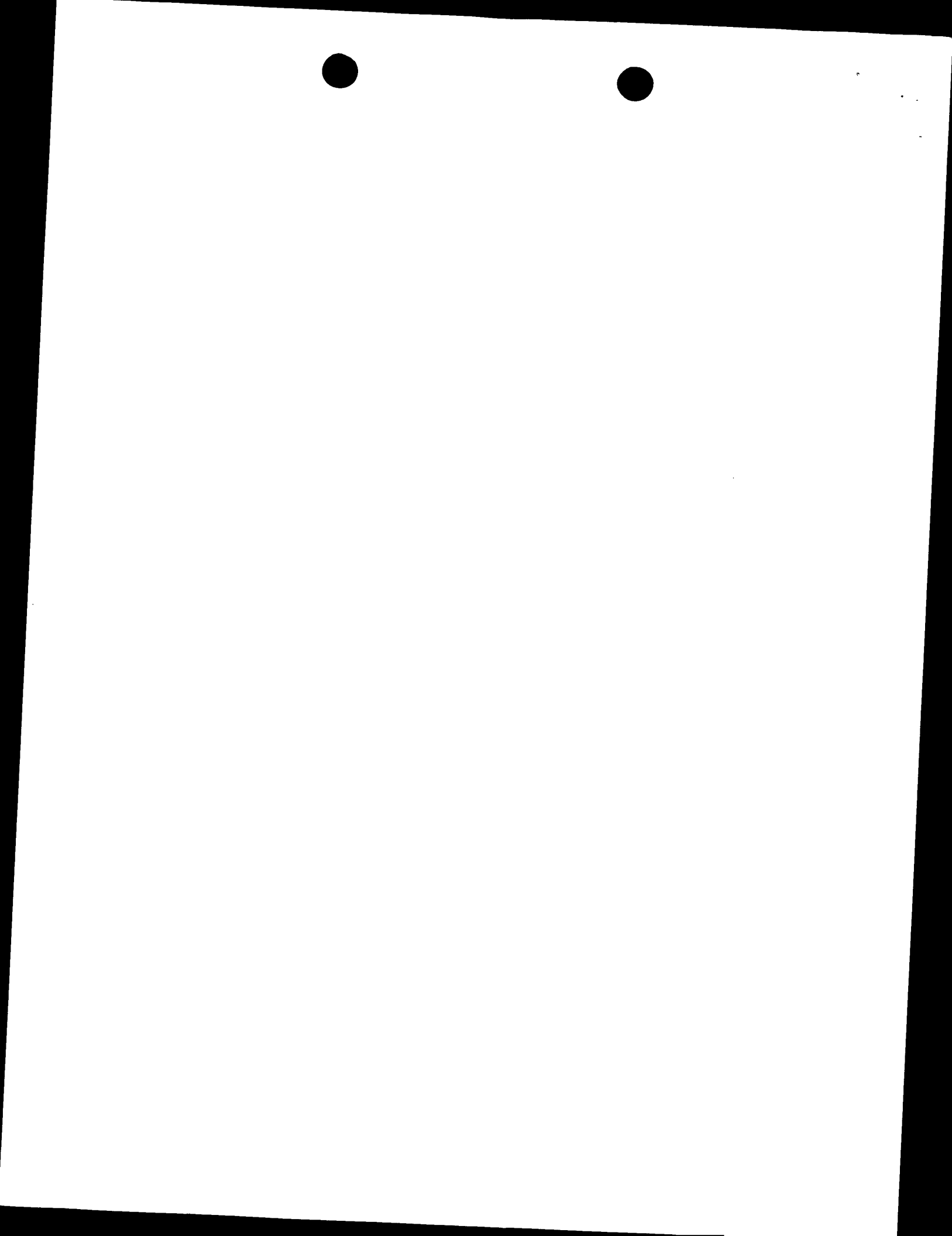
3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択  
国の選択を取り下げる件

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝





委任状

1999年10月7日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯憲生氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「I K K - i キナーゼの新たな基質 I - T R A F の同定」  
に関する一切の件



2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び  
選択国の選択を取り下げる件

あて名 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202

氏名 審良 静男



あて名 大阪府高石市取石5丁目4-18

氏名 嶋田 高広







フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

1. 出願人名称      科学技術振興事業団  
Japan Science and Technology Corporation
2. 代理人氏名      佐伯 憲生    SAEKI Norio
3. 国際出願の表示    26.10.99 提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類番号    JA901491
4. 発明の名称      IKK-i キナーゼの新たな基質 I-TRAF の同定
5. 使用した文字列コード JISコード
6. 配列を記載したファイル名  
JA901491.TXT
7. 連絡先  
    電話番号      03 (5205) 2521  
    担当者氏名    木下 真由美





陳述書

特許庁長官 殿



本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成11年10月26日

国際出願の表示

26.10.99提出の国際出願

出願人又は代理人の書類番号

JA901491

発明の名称

IKK-iキナーゼの新たな基質I-TRAFの同定

代理人

(10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio





優先権証明願 (P C T)

特許庁長官 殿



1. 出願番号 平成10年特許願第304085号

2. 請求人

識別番号 100102668

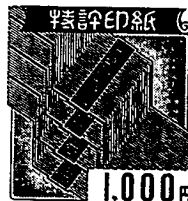
住所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目  
15番2号  
高愛ビル 9階

氏名 弁理士 佐伯憲生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,500円)



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 15/54, 9/12, A61K 31/70, 38/46	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> WO00/24908  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年5月4日(04.05.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/05916  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年10月26日(26.10.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/304085      1998年10月26日(26.10.98)      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</b> 審良 静男(AKIRA, Shizuo)[JP/JP] 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202 Osaka, (JP) 嶋田 高広(SHIMADA, Takahiro)[JP/JP] 〒592-0013 大阪府高石市取石5丁目4-18 Osaka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 佐伯 憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: IDENTIFICATION OF NOVEL SUBSTRATE I-TRAF OF IKK-i KINASE</b>  <b>(54) 発明の名称</b> IKK-iキナーゼの新たな基質I-TRAFの同定  <b>(57) Abstract</b> Novel I $\kappa$ B kinase IKK-i which is a novel serine/threonine kinase capable of activating a transcription factor NF- $\kappa$ B which inhibits the expression of various genes relating to immune response; a gene encoding the same; and medicinal compositions containing the same.		

(57)要約

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I $\kappa$ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I $\kappa$ BキナーゼIKK-i、その遺伝子及び医薬組成物に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BJ	ベナン	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		



## 明 細 書

## I K K - i キナーゼの新たな基質 I - T R A F の同定

技術分野

本発明は、新規な I  $\kappa$  B キナーゼ、その遺伝子及び医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 N F -  $\kappa$  B を活性化することができ、かつ I - T R A F に結合しリン酸化する新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規 I  $\kappa$  B キナーゼ I K K - i に関する。

背景技術

マクロファージは生体防御において重要な役割を果たしており細菌感染や悪性腫瘍の浸潤に対し、貪食、抗原提示、などの機能を果たすことが知られている。またマクロファージはリポポリサッカライド (L P S) や炎症性サイトカインによって活性化され、主要組織適合抗原、T N F -  $\alpha$  (tumor necrosis factor -  $\alpha$ )、I L - 1  $\beta$  (interleukin - 1  $\beta$ )、I L - 6 (interleukin - 6)、M I P - 1  $\alpha$  /  $\beta$  (macrophage inflammatory protein - 1  $\alpha$  /  $\beta$ ) などの免疫応答に関わる種々の遺伝子を発現することが知られている。

N F -  $\kappa$  B は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子である。L P S、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\beta$  などによって活性化され、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\beta$ 、I  $\kappa$  B -  $\alpha$  など免疫応答に重要な遺伝子の転写が N F -  $\kappa$  B の支配を受けていることが知られている。

本発明者らは、免疫応答に関わる新規遺伝子を同定するため、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行した。得られた遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は、最近同定され N F -  $\kappa$  B を活性化することが知られている I  $\kappa$  B キナーゼ -  $\alpha$  ,  $\beta$  (I  $\kappa$  B kinase -  $\alpha$  ,  $\beta$ ) (DiDonato JA, et al., Nature 1997 Aug 7;388(6642):548-554 ; Zandi E, et al., Cell 1997 Oct 17;91(2):243-252 ; Mercurio

F, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):860-866 ; Woronicz JD, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):866-869 ; Regnier CH, et al., Cell 1997 Jul 25;90(2):373-383) とホモロジーを持つ新規遺伝子であることが明らかになり、本発明者らはこの新規遺伝子がコードする蛋白質を IKK-i (inducible-I $\kappa$ B kinase) と命名した。

#### 発明の開示

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規 I $\kappa$ B キナーゼ IKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明者らは、IKK-i は I $\kappa$ B- $\alpha$  をリン酸化し NF- $\kappa$ B を活性化する新規セリン/スレオニンキナーゼであることを証明し、その発現が種々の炎症性サイトカインにより誘導されることを明らかにした。

本発明は、配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び/又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することができる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は新規なセリン/スレオニンキナーゼである。

また、本発明は、前記の新規な蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列を有する遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することができ免疫応答機構に作用する。また本発明の医薬組成物は、I-TRAF 又は TRAF 分子が関与する疾患の予防、治療剤として有用である。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、LPS による刺激前 (-) と刺激後 (+) の IKK-i の mRNA

発現の誘導のノザンプロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第2図は、I K K - i のL P S 刺激後のm R N A 発現を時間の経過によりノザンプロット解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第3図は、ヒトI K K - i とマウスI K K - i のアミノ酸配列の比較を示す。図中の長方形で囲まれた部分は同一の配列を示し、[ ] の部分はキナーゼドメインを示し、\*印はロイシンジッパードメインを示す。

第4図は、I K K - i とI K K -  $\alpha$ 、I K K -  $\beta$  のアミノ酸配列の比較を示す。図中のバックをグレーに配色した部分は同一の配列を示し、[ ] の部分はキナーゼドメインを示し、長方形で囲んだ部分はアクチベーションループを示し、\*印はキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基を示す。

第5図は、ノザンプロット解析による各臓器におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。

第6図は、ノザンプロット解析によるB - 細胞とT - 細胞におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第7図は、ノザンプロット解析によるマウスの腫瘍株におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はエチジウムブロマイドで染色したトータルR N A を示す。

第8図は、マウス腹腔マクロファージにおけるノザンプロット解析による種々の刺激によるI K K - i の誘導を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第9図は、I K K - i の強制発現によるN F -  $\kappa$  B レポーター遺伝子の活性化の結果を示したものである。図の下段は、タンパク量を抗F L A G 抗体 (M 2) によるイミュノプロットにより評価した結果を示す図面に代わる写真である。

第10図は、インビトロでのI K K - i によるI  $\kappa$  B -  $\alpha$  のリン酸化の結果を示した図面に代わる写真である。図の下段は、タンパク量を抗F L A G 抗体 (M 2) によるイミュノプロットにより評価した結果である。

第11図は、IKK-iとI-TRAFの細胞内における複合体の形成を示す図面に代わる写真である。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。

第12図は、I-TRAFの欠失変異体を用いたKK-iとの結合領域の検索を示す図面に代わる写真である。第12図のレーン1は1-170断片を、レーン2は1-247断片を、レーン3は193-stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第13図は、IKK-iによるI-TRAFのリン酸化を示す図面に代わる写真である。第13図のレーン1、3及び5はFlag-IKK-iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。

第14図は、I-TRAFのリン酸化部位の検索の結果を示す図面に代わる写真である。第14図のレーン1及び5は1-170断片を、レーン2及び6は1-247断片を、レーン3及び7は193-stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第15図は、精製GST-I-TRAFのIKK-iによるリン酸化を示す図面に代わる写真である。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i(K38A)をトランスフェクションしたものを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

まず、本発明のIKK-iのcDNAクローニングについて説明する。

サブプレシオンサブトラクティブハイブリダイゼーション法(suppression subtractive hybridization technique)を用いて、マクロファージ系腫瘍株であるRAW264.7のリボポリサッカライド(LPS)刺激における(+)群と(-)群との間でサブトラクションを施行し、LPS刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。MIP-1 $\alpha/\beta$ 、G-CSF、TNF- $\alpha$ などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。

このうちクローン#2F9は、刺激を加えないRAW264.7ではわずかに発現を認めるのみだが4時間のLPS刺激後、劇的に発現量が増加した(第1図参照)。第1図は、マクロファージ系腫瘍株RAW264.7をリボポリサッカライド(LPS)で刺激して誘導されてくる遺伝子のノザンプロット解析を示したものである。RAW264.7のLPS(100 ng/ml)刺激前(-)後(+)のポリ(A)<sup>+</sup>RNA 2  $\mu$ gを1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られたIKK- $\alpha$ のcDNAフラグメント(2F9)をプローブに用いてハイブリダイズさせた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第1図の下段に示した。

また、このmRNAの発現の時間経過を調べると、LPS刺激後2時間から増加し始め、4時間でピークに達し24時間でもとのレベルに戻った(第2図参照)。

第2図は、RAW264.7を100 ng/mlのLPSで刺激し、各レーン上に示した時間の後にトータルRNAを抽出し25  $\mu$ gずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、第1図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはマウスIKK- $\alpha$  (mIKK- $\alpha$ )のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第2図の下段に示した。

RAW264.7を4時間LPS刺激して得たmRNAからcDNAライブラリーを作製し、2F9のフラグメントをプローブとしてこの遺伝子の全長を得た。この遺伝子は2154 bpのオープンリーディングフレーム(open reading frame)に718アミノ酸をコードしていた。ホモロジー検索の結果、データベース上では塩基配列のみが決定され、機能が未知のヒトcDNAクローンKIAA0151と最もホモロジーが高く、相同性はアミノ酸レベルで82.3%であり2F9はKIAA0151のマウスのカウンターパートであると考えられた。

KIAA0151に次いで相同性の高かった遺伝子は、最近同定されIKB- $\alpha$ をリン酸化しNF- $\kappa$ Bを活性化することが明らかになったIKBキナーゼ- $\alpha$ ,  $\beta$  (IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ )であり、キナーゼドメインの相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ29.1%、30.1%であった。

2 F 9、K I A A 0 1 5 1にはともにN-末端にセリン／スレオニンキナーゼドメイン、中央にロイシンジッパードメインが2つ認められ、I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$ との構造の類似性と後に述べるこの分子の機能から、本発明者らはこの新規キナーゼを*i n d u c i b l e - I K K ( I K K - i )*と命名した。

ヒトI K K-*i*とマウスI K K-*i*のアミノ酸配列の比較を第3図に、ヒトI K K-*i*、ヒトI K K- $\alpha$ 、ヒトI K K- $\beta$ のアミノ酸配列の比較を第4図に示した。

第3図では、同一の配列を長方形で囲んでおり、キナーゼドメインを[]で示した。また、ロイシンジッパードメインの下に\*印を記している。

第4図では、同一の配列のバックをグレーに配色し、キナーゼドメインを[]で示している。アクチベーションループを長方形で囲んでおり、アクチベーションループの配列でキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基の上に\*印を記している。I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$ のヘリックスループ-ヘリックス構造の下にアンダーラインを引いている。

次に本発明者らは、各臓器におけるI K K-*i*の発現をノザンプロットで解析した。I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$ がどの組織にも普遍的に発現しているのに対しI K K-*i*のmRNAは脾臓、胸腺、末梢血白血球、脾臓、胎盤に特異的に多く発現していた(第5図参照)。第5図の各レーン上に記された臓器から得られたポリ(A)<sup>+</sup>RNA 2  $\mu$ gがプロットされたマルチティッシュノザンプロットメンブレン(Clontech)を用いてノザンプロット解析を行った。プローブはヒトI K K-*i* (h I K K-*i*)のコーディング領域を用いた。

脾臓で認められるI K K-*i*の発現がどの細胞集団に由来するものなのかを調べるために、抗B 2 2 0抗体を使ってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はL P Sの刺激前(-)後(+)で、T-細胞はフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激前(-)後(+)でそれぞれI K K-*i*の発現をノザン解析した。B-細胞ではL P S刺激しなければ検出できないが、L P S刺激により発現が誘導された。T-細胞では構成的に発現しているがフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激により発現が低下した(第6図参照)。

第6図は、C 5 7 B L / 6から採取した脾細胞から抗体(B 2 2 0)を用いて、

高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はLPS:  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン:  $10 \mu\text{M}$ とPMA:  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ で4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し $20 \mu\text{g}$ ずつ、1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはマウスIKK-i (mIKK-i) のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第6図の下段に示した。

次に、いくつかのマウスの細胞株におけるIKK-iの発現をLPS刺激前(-) 後(+)で解析した。5E3 (natural killer cell clone) とM1 (Monocytic leukemia cell line) においてLPS刺激によってIKK-iの発現が誘導された(第7図参照)。

第7図の各レーン上に記された腫瘍株NIH3T3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5E3 (natural killer cell clone)、MOPC 315 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、M1 (monocytic leukemia cell line) から、4時間のLPS ( $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ) 刺激前(-) 後(+)でトータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果である。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータルRNAの電気泳動像を用いて第7図の下段に示した。

さらに、LPS以外の刺激によってもIKK-iの発現が増強するのか否かを検討した。C57BL/6から採取した腹腔マクロファージをLPS、PMA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6によって4時間刺激した後にIKK-iの発現を見た。IKK-iはLPS以外にもTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6によっても発現が誘導されたがPMAによっては誘導されなかった(第8図参照)。

第8図は、C57BL/6から採取した腹腔マクロファージを、第8図の各レーン上に示した様にLPS:  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、PMA:  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 、TNF- $\alpha$ :  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IL-1 $\beta$ :  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IFN- $\gamma$ :  $250 \text{ U}$

／m l、I L-6：2000 U／m lで刺激後トータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはm I K K-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG 3 P D Hを用いて第8図の下段に示した。

I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$ は細胞内に強制発現させるとN F- $\kappa$  Bを活性化することがレポータージーンアッセイにより証明されている。I K K-iにおいてもその構造の類似性からN F- $\kappa$  Bを活性化する可能性があると考えことから、レポータージーンアッセイによりI K K-iのN F- $\kappa$  B活性化能を検討した。

まず、I K K-iのN-末端にF L A Gエピトープをタグしp E F-B O S発現ベクターに組み込んだ構築を作製した(p E F-B O S-F L A G-W T-I K K-i)。p E F-B O S-F L A G-I K K-iまたはベクターのみのコントロールをN F- $\kappa$  Bのルシフェラーゼレポーターコンストラクトと293 T細胞に一過性的にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。この結果、I K K-iはその発現量依存性にN F- $\kappa$  Bを活性化することが明らかになった(第9図参照)。

第9図は、293 T細胞に、N F- $\kappa$  Bコンセンサスシーケンスにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターコンストラクト(p N F- $\kappa$  B-L u c)と、I K K-i遺伝子のN-末端にF L A Gエピトープをタグしp E F-B O S発現ベクターにサブクローンしたコンストラクト(p E F-B O S-F L A G-W T-I K K-i)またはベクターのみのコントロールを一過性的にコトランスフェクションしルシフェラーゼ活性を測定した結果を示したものである。総DNA量はp E F-B O S-ベクターによって4  $\mu$  gに統一した。トランスフェクトしたp E F-B O S-F L A G-W T-I K K-iの量をグラフの下に示し、第9図の下段にタンパク量を抗F L A G抗体(M 2)によるイミュノプロットにより評価したものを示す。

I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$ はインビトロでI  $\kappa$  B- $\alpha$ をリン酸化することが知られている。そこで、本発明のI K K-iが、I  $\kappa$  B- $\alpha$ のN-末端に存在する32番目と36番目のセリン残基をリン酸化するの否かをインビトロキナーゼアッセイ(in vitro kinase assay)により解析した。



pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i又はIKK-iの38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)を293T細胞に一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。

基質として、 $I\kappa B-\alpha$ のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(WT)、またはGST-I $\kappa B-\alpha$ Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(AA)を用いた。約80kDaにIKK-iの自己リン酸化のバンドがBOS-FLAG-WT-IKK-iのレーンに認められた。IKK-iはGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(WT)をリン酸化したが、K38A-IKK-iはGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(WT)をリン酸化しなかった。また、IKK-iはGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(AA)を全くリン酸化しなかった(第10図参照)。

第10図は、インビトロ(in vitro)でのIKK-iによる $I\kappa B-\alpha$ のリン酸化の結果を示したものである。293T細胞にpEF-BOS-MOCKまたはpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iまたは38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)を一過性的にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。基質として $I\kappa B-\alpha$ のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I $\kappa B-\alpha$ Nタンパク(WT)、またはGST-I $\kappa B-\alpha$ Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたタンパク(AA)を大腸菌に発現させグルタチオンセファロースで精製したものをを用いた。IKK-iまたはK38A-IKK-iと基質と $[\gamma-^{32}P]$ ATPを30℃、20分間反応させた後SDS-PAGEに展開後オートラジオグラフィにて評価した。矢印で自己リン酸化のバンドとGST-I $\kappa B-\alpha$ Nのバンドを示した。分子量(単位

kDa) を左に示した。第10図の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノブロットにより評価した結果を示した。

以上の結果から、本発明のIKK-iは、NF- $\kappa$ Bの活性化に重要なIKBのN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することが明らかになった。

本発明のIKK-iのcDNAクローニングの結果明らかにされた塩基配列及びそのアミノ酸配列を配列表に示す。配列番号1はヒトIKK-i(hIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号2はhIKK-iのアミノ酸配列を示している。また、配列番号3はマウスIKK-i(mIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号4はmIKK-iのアミノ酸配列を示している。

本発明のIKK-iは、N-末端にキナーゼドメインを、中央にロイシンジッパードメインを有する新規のセリン/スレオニンキナーゼであり、そのmRNAの発現はマクロファージにおいてLPS刺激によって誘導されることが明らかになった。本発明のIKK-iのアミノ酸配列は、IKBをリン酸化し、NF- $\kappa$ Bを活性化するIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と高い相同性を示した。

本発明のIKK-iは、脾臓、胸腺、末梢血白血球などに構成的に発現しており、脾臓ではT-細胞に構成的に発現していた。またB-細胞、腹腔マクロファージ、ナチュラルキラー(natural killer)細胞、モノサイト系腫瘍株をLPS刺激すると発現が増強し、腹腔マクロファージをTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6で刺激することによっても発現が増強した。これらのノザンブロット解析の結果から、IKK-iの発現が、主に免疫担当細胞や炎症反応に関わる細胞に偏っており、炎症性の刺激により増強したことからIKK-iは炎症反応に関わる分子であると考えられる。

IKK-iのNF- $\kappa$ B活性能をレポータージーンアッセイによって解析したところ、293T細胞にIKK-iを強制発現すると蛋白量依存性にNF- $\kappa$ Bが活性化されることが明らかになった。IKK-iはIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と同様にIKB- $\alpha$ のN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することがインビトロキナーゼアッセイで明らかになったので、レポータージーンアッセイで観察されたNF- $\kappa$ B活性能は、IKK-iがIKB- $\alpha$ のN-末端をリン酸化することに依存するものであると考えられた。IKK-iは免疫担当細胞において炎

症性の刺激により発現が誘導され、NF- $\kappa$ Bを活性化する新規なIKKキナーゼであることがわかった。

本発明のIKK-iは、LPS刺激2時間後から発現量が増加すること、発現量依存性にNF- $\kappa$ Bを活性化することから、LPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化の維持に貢献している可能性がある。IKK-iはIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と比べその発現が免疫担当細胞に偏っているため、そのインヒビターの開発は免疫系特異的にNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制できる可能性があり、IKK-iのコントロールは炎症性疾患の治療に貢献できることになる。

さらに、本発明のIKK-iと相互作用する分子を単離するため、酵母ツーハイブリッド法を行った。ヒトIKK-iのアミノ酸541～716番目をGAL4 DNA結合領域(Binding Domain)とのキメラタンパク質が発現できるようpAS2-1プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母Y190株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に、GAL4活性化領域(Activation Domain)とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒトB細胞由来のcDNAライブラリーを含むpACT2プラスミドで形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的にDNAシーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10クローンが既に配列が報告されているI-TRAF/TANKと同一であった。

そこで、実際に細胞内においてIKK-iとI-TRAFが結合するかどうかを検討した。まず哺乳細胞内で発現可能な発現ベクターを構築した。ヒトIKK-iのN-末端側にFlagをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。またヒトI-TRAFのN-末端側にMycをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。これらをサル腎臓細胞株であるCOS-7細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24時間後、細胞を1.0%のNonidet P-40を含むバッファーで可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗Myc抗体あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第11図に示す。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-i (第11図上、レーン3)と抗Flag抗体で共免疫沈降されるMyc-I-TRAF (第11図中下、レーン3)とのバンドが特異的に検出された。従って、両分子が哺乳細胞内においても複合体を形成していることが明かとなった。また各レーンにおける発現量は抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体での免疫沈降物を抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことにより確認することができる(第11図、中上、下)。

次にI-TRAFのどの領域を介してIKK-iと結合しているかを上記と同様の手法を用いて検討した。まず3種類のI-TRAF欠失変異体を作製した。N-末端にMycを付加したヒトI-TRAFのアミノ酸配列の1~170、1~247あるいは193~C末端(stop)までの断片をpEF-BOSに組み込んだ。これらをCOS-7細胞にFlag-IKK-iと共にトランスフェクションを行った。24時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗Myc抗体で免疫沈降後、抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第12図に示す。第12図のレーン1は1~170断片を、レーン2は1~247断片を、レーン3は193~stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。これらを発現させた細胞において、抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-iのバンドが検出された(第12図上)。従ってI-TRAFはN-末端側の170アミノ酸を介してIKK-iと結合していることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗Flag抗体(第12図中)、あるいは抗Myc抗体(第12図下)でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける基質かどうかを検討した。COS-7細胞にFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFをトランスフェクションし、24時間後可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファーと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第13図に示す。レーン1、3及び5はFlag-IKK-iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。この結果から、抗Flag(レーン2)および抗Myc抗体(レーン4)のいずれの免疫沈降物中において、Myc-I-TRAFのリン酸化のバンドが検出された。従ってMyc-I-TRAFはIKK-iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗Flag抗体(第13図のレーン5、6上)、あるいは抗Myc抗体(第13図のレーン5、6下)でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I-TRAFのどの領域がリン酸化を受けるか検討した。Myc-I-TRAFの欠失変異体(1~170断片、1~247断片、193~stop断片、全長(FL))をIKK-iと共にCOS-7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1~170断片を、レーン2及び6は1~247断片を、レーン3及び7は193~stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。この結果からFL(レーン4、8)に加えMyc-I-TRAF(1~247)(レーン2、6)のリン酸化が認められた。従って少なくともI-TRAFの171~247内にIKK-iによりリン酸化を受ける部位が存在していると考えられる。

さらに、I-TRAFの精製タンパク質を用いて、これがIKK-iによりリン酸化を受けるかどうか検討した。まずI-TRAFタンパク質の精製を行った。ヒトI-TRAF cDNAを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドpGEX-5X-1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌DH5αに形質転換を行った。大腸菌をLB液体培地にて終夜培養後、IPTGを添加し3時間後に回収した。大腸菌をPBSで溶かし超音波処理により破碎した。これにTriton X-100を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反

応させた。グルタチオンセファロースに結合したGST-I-TRAFタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。次にCOS-7細胞にFlag-IKK-iをトランスフェクションした。同時に変異体IKK-i (K38A)を作製しトランスフェクションを行った。K38A変異体はATP結合部位と考えられるキナーゼドメイン内に存在する38番目のリジンをアラニンへ置換したものであり、多くのキナーゼはこの部位の変異によりキナーゼ活性を失うことが知られている。トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗Flag抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したGST-I-TRAFを1.0  $\mu$ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i (K38A)をトランスフェクションしたものを示す。このようにFlag-IKK-iを発現させた細胞でGST-I-TRAFのリン酸化が認められた(第15図のレーン1の上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(第15図のレーン2の上)。従ってI-TRAFはIKK-iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また、K38Aが細胞内において発現していることは、可溶化物を抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図の下)。

これらの結果、IKK-iがI-TRAFとも結合することが明らかとなった。さらにインビトロキナーゼアッセイによりI-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける特異的基質であることが明らかとなった。I-TRAFは当初TRAF2およびTRAF3に結合する分子として同定された分子である。TRAF分子は現在6種類同定されており、様々なレセプターに結合するアダプター分子として機能していることが知られている。特にTRAF分子はアポトーシスに関連するTNFレセプターやCD40と結合するものであり、これらのレセプター類のシグナル伝達系物質として知られている。

TRAF分子はリカンドの刺激によりレセプターと複合体を形成し活性化されるが、活性化されていない状態では細胞質内においてI-TRAFと結合するこ

とにより活性化が負に制御されていると考えられている。従って I K K - i は I - T R A F をリン酸化することで T R A F 分子の活性化に間接的に関与していると考えられる。

以上のように、本発明の I K K - i はアポトーシスなどに関連する T R A F 分子の活性化に関与していることから、T R A F 分子に関連するアポトーシス関連疾患の予防、治療、制御などに有用となる。

このように I K K - i は臨床的な観点からも非常に興味深い分子であると考えられる。本発明の医薬組成物は、I K K - i と製薬上許容される担体とからなるものであり、投与可能な形態として投与することができる。投与量は患者の状態に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物は、免疫応答機能の改善や炎症性疾患の治療に有効である。

また、本発明においては、I K K - i 遺伝子に対するアンチセンスを本発明の医薬組成物の成分として使用することも包含するものである。

### 実施例

次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1 (m I K K - i の c D N A クローニング)

サブプレシヨンサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (suppression subtractive hybridization technique) を用いて、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 1 0 0 n g / m l での刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行し、L P S 刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、M I P - 1  $\alpha / \beta$ 、G - C S F、T N F -  $\alpha$  などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。7つの新規遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は 3 7 4 b p の遺伝子断片であった。クローン # 2 F 9 の遺伝子の全長を得るため、我々はまず、R A W 2 6 4 . 7 を 4 時間 L P S 刺激して得た m R N A から  $\lambda$  Z A P ファージを用いて c D N A ファージライブラリーを作製した。2

F 9 の 3 7 4 b p の フ ラ グ メ ン ト を ラ ン ダ ム ラ ベ リ ン グ 法 に て  $\alpha$ - $^{32}$ P-d C T P で 標 識 し、標 識 さ れ た 2 F 9 を プ ロ ー プ と し て、c D N A フ ェ ー ジ ラ イ ブ ラ リ ー を ス ク リ ー ニ ン グ し て 遺 伝 子 の 全 長 を 得 た。

得 ら れ た ク ロ ー ン の 全 長 は 2 9 1 0 b p で あ っ た。こ の 遺 伝 子 は 2 1 5 1 b p の オ ー プ ン リ ー デ ィ ン グ フ レ ー ム (open readin frame) に 7 1 7 個 の ア ミ ノ 酸 を コ ー ド し て い た。こ の 遺 伝 子 の 塩 基 配 列 を 配 列 番 号 3 に 示 す。ま た、そ の ア ミ ノ 酸 配 列 を 配 列 番 号 4 に 示 す。

#### 実施例 2 (h I K K - i の c D N A ク ロ ー ニ ン グ)

既 に D D B J に 登 録 さ れ て い た 塩 基 配 列 K I A A 0 1 5 1 を も と に し て、ヒ ト 胎 盤 の c D N A ラ イ ブ ラ リ ー を テ ン プ レ ー ト と し て P C R 法 に よ り、ヒ ト の I K K - i の c D N A を ク ロ ー ニ ン グ し た。こ の と き の P C R 法 に 用 い た プ ラ イ マ ー の 配 列 は、

5'-ctttgcctgactcagggcagctcagag-3'、及 び、

5'-atggtgcagaagagcagtggttgaatc-3'

で あ っ た。

こ の 遺 伝 子 は、2 1 4 8 b p の オ ー プ ン リ ー デ ィ ン グ フ レ ー ム (open readin frame) に 7 1 6 個 の ア ミ ノ 酸 を コ ー ド し て い た。こ の 遺 伝 子 の 塩 基 配 列 を 配 列 番 号 1 に 示 す。ま た、そ の ア ミ ノ 酸 配 列 を 配 列 番 号 2 に 示 す。

#### 実施例 3 (L P S 刺 激 に よ る ク ロ ー ン # 2 F 9 の 発 現)

マ ク ロ フ ェ ー ジ 系 腫 瘍 株 R A W 2 6 4 . 7 を リ ボ ポ リ サ ッ カ ラ イ ド (L P S) で 刺 激 し て 誘 導 さ れ て く る 遺 伝 子 の ノ サ ン プ ロ ッ ト 解 析 を 行 っ た。

R A W 2 6 4 . 7 の L P S (1 0 0 n g / m l) 刺 激 前 (-) 後 (+) の ポ リ (A)<sup>+</sup> R N A 2  $\mu$  g を 1 % フ ォ ル ム ア ミ ド - ア ガ ロ ー ス に て 電 気 泳 動 し、ナ イ ロ ン メ ン ブ レ ン に 転 写 後、サ ブ ト ラ ク シ ョ ン で 得 ら れ た I K K - i の c D N A フ ラ グ メ ン ト を プ ロ ー プ に 用 い て ハ イ ブ リ ダ イ ズ さ せ た。

結 果 を 第 1 図 に 示 す。な お、R N A 量 が 等 量 で あ る こ と を G 3 P D H を 用 い て 第 1 図 の 下 段 に 示 し た。



#### 実施例 4 (LPS 刺激によるクローン # 2 F 9 の発現の時間経過)

RAW 264.7 を  $100 \text{ ng/ml}$  の LPS で刺激し、0.5 時間、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、及び、24 時間経過後にトータル RNA を抽出し、 $25 \mu\text{g}$  ずつ 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、実施例 3 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは実施例 2 で得られたマウス IKK- $i$  (mIKK- $i$ ) のコーディング領域を用いた。

結果を第 2 図に示す。なお、RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて第 2 図の下段に示した。

#### 実施例 5 (IKK- $i$ の発現)

各臓器における IKK- $i$  の発現をノザンプロットで解析した。

各臓器から得られた poly(A)<sup>+</sup> RNA  $2 \mu\text{g}$  がプロットされたマルチティッシュノザンプロットメンブレン (Clontech) を用いてノザンプロット解析を行った。プローブは hIKK- $i$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 5 図に示す。第 5 図中の矢印は、IKK- $i$  の位置を示している。

#### 実施例 6 (脾臓における IKK- $i$ の発現)

C57BL/6 から採取した脾細胞から抗体 (B220) を用いて、高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によって B-細胞と T-細胞を分離した。B-細胞は LPS :  $100 \mu\text{g/ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン :  $10 \mu\text{M}$  と PMA :  $10 \text{ ng/ml}$  で 4 時間刺激し、各刺激の前後でトータル RNA を抽出し  $20 \mu\text{g}$  ずつ 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動させて、実施例 4 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは mIKK- $i$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 6 図に示す。なお、RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて第 6 図の下段に示した。

### 実施例 7 (マウスの細胞における IKK- $\alpha$ の発現)

マウスの細胞株、腫瘍株 NIH 3 T 3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5 E 3 (natural killer cell clone)、MOPC 3 1 5 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、及び、M1 (monocytic leukemia cell line) のそれぞれに、LPS (100 ng/ml) 刺激前 (-) 及び 4 時間の LPS 刺激後 (+) のトータル RNA を抽出し、実施例 4 と同様にノザンブロット解析を行った。プローブは mIKK- $\alpha$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 7 図に示す。なお、RNA 量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータル RNA の電気泳動像を用いて第 7 図の下段に示した。

### 実施例 8 (腹腔マクロファージにおける IKK- $\alpha$ の発現)

C57BL/6 から採取した腹腔マクロファージを、LPS: 1  $\mu$ g/ml、PMA: 10 ng/ml、TNF- $\alpha$ : 100 ng/ml、IL-1 $\beta$ : 100 ng/ml、IFN- $\gamma$ : 250 U/ml、IL-6: 2000 U/ml でそれぞれ刺激した後、トータル RNA を抽出し、実施例 4 と同様にノザンブロット解析を行った。プローブは mIKK- $\alpha$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 8 図に示す。第 8 図中の (-) は刺激をしなかった場合を示している。なお、RNA 量が等量であることを GAPDH を用いて第 8 図の下段に示した。

### 実施例 9 (IKK- $\alpha$ 発現ベクターの構築)

IKK- $\alpha$  遺伝子の N-末端に FLAG エピトープを結合させた。FLAG-hIKK- $\alpha$  フラグメントの 5' 端と 3' 端に制限酵素 SalI サイトをつくり、次に示すプライマー配列 1 (1) 及び (2) を用いて、PCR 法にて作成した。

(1) 5'-gggtcgacca ccatggacta caaggacgac gatgacaaga tgcagagcac agccaat-3'

(2) 5'-gtcgactcag accatcagga ggtgc-3'

これを T-ベクター (pGEM-T) (Promega) にサブクローン後、制限酵素 SalI で切り出して、pEF-BOS 発現ベクターへサブクローンして、発現ベクター pEF-BOS-FLAG-WT-IKK- $\alpha$  を構築した。

#### 実施例 10 (IKK-i による NF- $\kappa$ B の活性化)

293T細胞  $3 \times 10^5$ 個に、NF- $\kappa$ B コンセンサスレポーターコンストラクト (pNF- $\kappa$ B-Luc) (Stratagene 社製) と、実施例 9 で得た IKK-i 発現ベクター pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i を、それぞれ  $0 \mu\text{g}$  (添加無し)、 $0.3 \mu\text{g}$ 、 $1.0 \mu\text{g}$ 、 $3.0 \mu\text{g}$  加えて、一過性的にトランスイット LT-1 (Transit LT-1) (Pan Vera Corporation 社製) を用いたリポフェクション法によりコトランスフェクションし、プロメガ (Promega) 社製のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Dual Luciferase Reporter assay system) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、コントロールとしてベクターのみを添加したものをを用いた。

総 DNA 量は pEF-BOS-ベクターによって  $4 \mu\text{g}$  に統一した。

結果を第 9 図に示す。なお、第 9 図の下段にタンパク量を抗 FLAG 抗体 (M2) によるイミュノブロットにより評価したものを示した。

#### 実施例 11 (IKK-i の 38 番目のリジンをアラニンにした変異体の製造)

ポイントミューテーションにより、IKK-i の 38 番目のリジンをコードしている塩基を、アラニンをコードする塩基にして、IKK-i の変異体の遺伝子を作成した。ポイントミューテーションは、トランスフォーマー・サイト・ディレクティッドミュータゲネシスキット (Clontech) を用いた。

#### 実施例 12 (IKK-i の変異体の発現ベクターの構築)

実施例 11 で得た変異体の遺伝子を用いて、実施例 9 と同様にして変異体の発現ベクター pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i を構築した。

#### 実施例 13 (GST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT) の製造)

I $\kappa$ B- $\alpha$  のアンキリンリピートより C-末端部分を切断したアミノ酸配列 1~72 をコードする遺伝子を製造し、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製して GST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT) を得た。ベクター

としてはファルマシア社製の p G E X 2 T を用いた。

実施例 14 (G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (A A) の製造)

G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ N の 32 番目と 36 番目のセリン残基をどちらもアラニン  
をコードする塩基に変えた遺伝子を製造して、これを大腸菌で発現させ、グルタ  
チオンセファロースで精製した G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (A A) を得た。

実施例 15 (I K K-i による I $\kappa$ B- $\alpha$  のセリン残基をリン酸化)

293T細胞  $2 \times 10^6$  個に、p E F-B O S-M O C K、実施例 9 で得た p E  
F-B O S-F L A G-W T-I K K-i、又は、実施例 12 で得たミュータン  
トコンストラクト (p E F-B O S-F L A G-K 38 A-I K K-i) をそれ  
ぞれ用いて、10 cm ディッシュ (d i s h) 上で一過性的にトランスフェク  
ションした。24 時間後に発現された I K K-i タンパクまたは K 38 A-I K  
K-i タンパクを抗 F L A G 抗体 (M 2) によって免疫沈降により精製し、イン  
ビトロキナーゼアッセイを行った。

インビトロキナーゼアッセイの基質として、実施例 14 で得た G S T-I $\kappa$ B  
- $\alpha$ Nタンパク (W T)、又は、実施例 15 で得たタンパク (A A) を用いた。  
I K K-i または K 38 A-I K K-i と基質と [ $\gamma$ - $^{32}$ P] A T P を 30 $^{\circ}$ C、  
20 分間反応させた後 S D S-P A G E に展開後オートラジオグラフィにて評価  
した。

結果を第 10 図に示す。第 10 図中の約 80 k D a の位置の矢印は、自己リン  
酸化のバンドを示し、その下の矢印は G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ N のバンドを示す。分  
子量 (単位 k D a) を第 10 図の左側に示している。なお、第 10 図の下段にタ  
ンパク量を抗 F L A G 抗体 (M 2) によるイミュープロットにより評価した結果  
を示した。

この結果、I K K-i は G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (W T) をリン酸化し  
たが、K 38 A-I K K-i は G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (W T) をリン酸  
化しなかった。また、I K K-i は G S T-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (A A) を全  
くリン酸化しなかった。

実施例 16 (酵母ツーハイブリッド法による I K K - i と相互作用する分子の単離)

ヒト I K K - i のアミノ酸 541 ~ 716 番目を G A L 4 DNA バインディングドメイン (Binding Domain) とのキメラタンパク質が発現できるよう p A S 2 - 1 プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母 Y 190 株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に G A L 4 アクティベーションドメイン (Activation Domain) とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒト B 細胞由来の c D N A ライブラリーを含む p A C T 2 プラスミドを形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的に D N A シーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10 クローンが既に配列が報告されている I - T R A F / T A N K と同一であった。

実施例 17 (細胞内における I K K - i と I - T R A F の結合)

ヒト I K K - i の N - 末端側に F l a g をエピトープとして付加し、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

また、ヒト I - T R A F の N - 末端側に M y c をエピトープとして付加し、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

さらに、ヒト I K K - i の N - 末端側に F l a g をエピトープとして付加し、これにヒト I - T R A F の N - 末端側に M y c をエピトープとして付加して、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

これらをサル腎臓細胞株である C O S - 7 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24 時間後、細胞を 1.0 % の N o n i d e t P - 40 を含むバッファーで可溶化して、可溶化物を抗 F l a g 抗体あるいは抗 M y c 抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗 M y c 抗体あるいは抗 F l a g 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

結果を第 11 図に示す。レーン 1 は F l a g - I K K - i を、レーン 2 は M y c - I - T R A F を、レーン 3 は F l a g - I K K - i と M y c - I - T R A F

を示す。

#### 実施例 18 (I-TRAF の IKK-i との結合領域の決定)

まず、N-末端に Myc を付加した、ヒト I-TRAF のアミノ酸配列 1~170、1~247 あるいは 193~stop 断片からなる 3 種類の I-TRAF 欠失変異体を作製した。これをそれぞれ pEF-BOS に組み込んだ。これらを COS-7 細胞に Flag-IKK-i と共にトランスフェクションを行った。24 時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗 Myc 抗体で免疫沈降後、抗 Flag 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第 12 図に示す。第 12 図中、レーン 1 は 1~170 断片、レーン 2 は 1~247 断片、レーン 3 は 193~stop 断片、レーン 4 は全長 (Full length) を示す。

#### 実施例 19 (I-TRAF の IKK-i によるリン酸化の確認)

COS-7 細胞に Flag-IKK-i と Myc-I-TRAF をトランスフェクションし、24 時間後可溶化した。可溶化物を抗 Flag 抗体あるいは抗 Myc 抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファーと [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第 13 図に示す。レーン 1、3 及び 5 は Flag-IKK-i のみをトランスフェクションしたものを、レーン 2、4 及び 6 は両者をトランスフェクションしたものを示す。

ように抗 Flag (レーン 2) および抗 Myc 抗体 (レーン 4) のいずれの免疫沈降物中において、Myc-I-TRAF のリン酸化のバンドが検出された。従って Myc-I-TRAF は IKK-i によりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は可溶化物を抗 Flag 抗体 (レーン 5、6 上)、あるいは抗 Myc 抗体 (レーン 5、6 下) でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

#### 実施例 20 (I-TRAF のリン酸化領域の決定)

My c-I-T R A Fの欠失変異体(1-170、1-247、193-stop、FL)をI K K-iと共にCOS-7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗F l a g抗体あるいは抗M y c抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1~170断片を、レーン2及び6は1~247断片を、レーン3及び7は193~stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

#### 実施例21(I-T R A Fタンパク質のI K K-iによるリン酸化)

ヒトI-T R A F c D N Aを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ(G S T)とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドp G E X-5 X-1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌D H  $\alpha$ に形質転換を行った。大腸菌をLB液体培地にて終夜培養後、I P T Gを添加し3時間後に回収した。大腸菌をP B Sで溶かし超音波処理により破碎した。これにT r i t o n X-100を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反応させた。グルタチオンセファロースに結合したG S T-I-T R A Fタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。

次にCOS-7細胞にF l a g-I K K-iをトランスフェクションした。同時に変異体I K K-i(K38A)を作製しトランスフェクションを行った。

トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗F l a g抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したG S T-I-T R A Fを1.0  $\mu$ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。F l a g-I K K-iを発現させた細胞でG S T-I-T R A Fのリン酸化が認められた(レーン1上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(レーン2上)。また、K38Aが細胞内において発現していること可溶化物を抗F l a g抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図下)。

#### 産業上の利用可能性

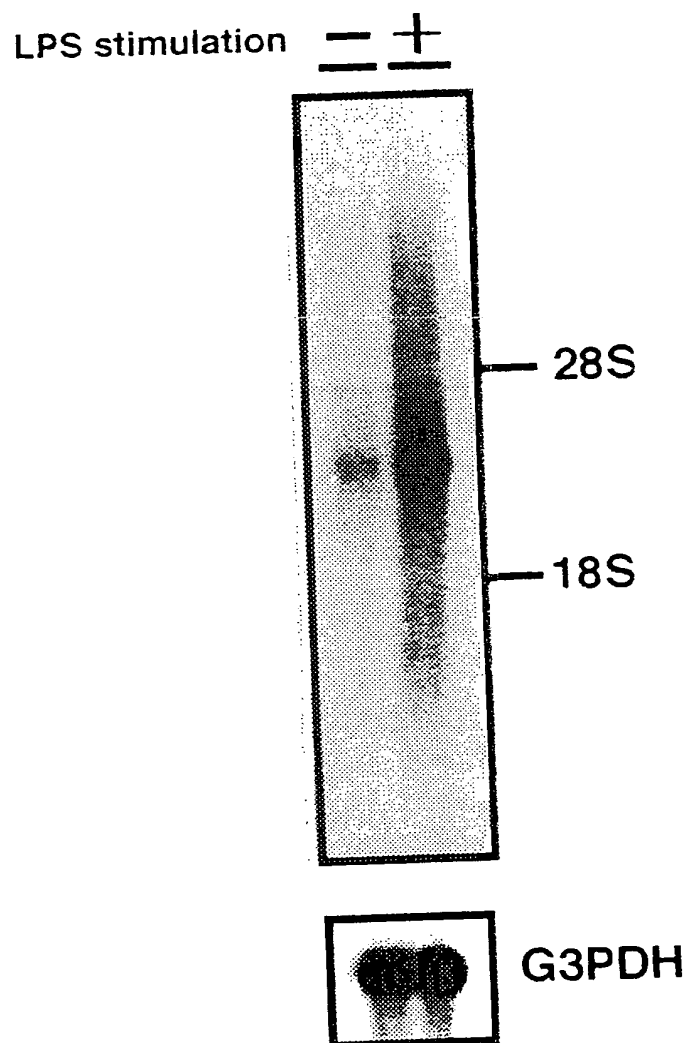
本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規IKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供するものである。本発明のIKK-iはIKB- $\alpha$ をリン酸化しNF- $\kappa$ Bを活性化することから、この遺伝子を制御することは、免疫応答機構の改善や炎症性疾患の治療に有用である。さらに、本発明のIKK-iはI-TRAFに結合し、これをリン酸化することから、アポトーシスなどに関連するTRAF分子の活性制御に有用である。



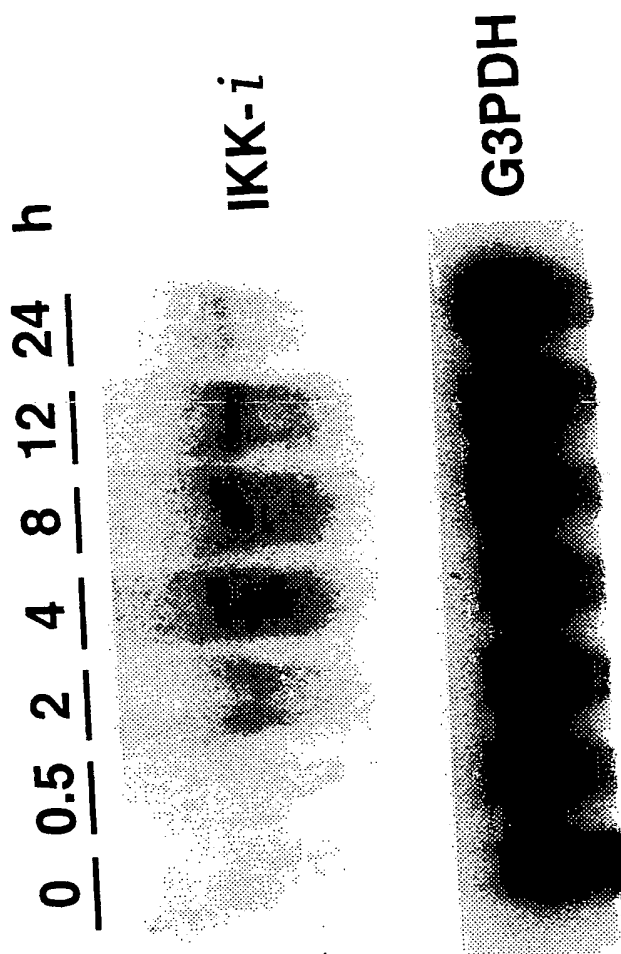
## 請 求 の 範 囲

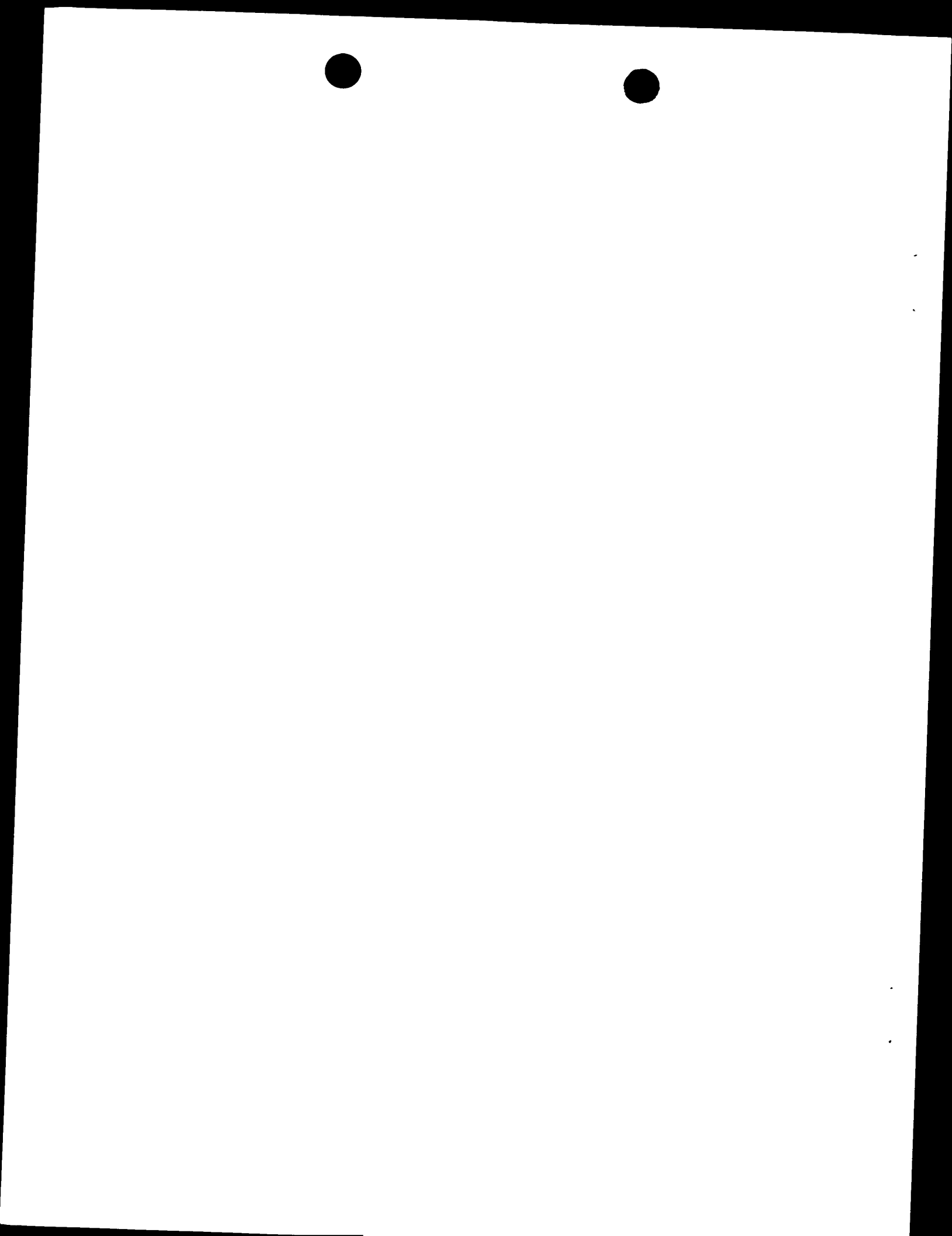
1. 配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することができる蛋白質。
2. セリン／スレオニンキナーゼである請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質。
3. I-TRAF に結合し、I-TRAF をリン酸化する活性を有する請求の範囲第 1 項又は第 3 項に記載の蛋白質。
4. 請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。
5. 塩基配列が、配列番号 1 又は 3 で表される塩基酸配列を有する請求の範囲第 4 項に記載の遺伝子。
6. 請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物。
7. 免疫応答機構に作用する請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。
8. I-TRAF 又は TRAF 分子が関与する疾患の予防、治療剤である請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。











h i k k - i 1: M Q S T A N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E L V A V K V F N T T S Y L R P R E V Q V R E F E V L R L N H Q N I V K L F A V E E 75  
 m i k k - i 1: M Q S T T N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E V V A V K V F N S A S Y R R P P E V Q V R E F E V L R L N H Q N I V K L F A V E E 75  
  
 h i k k - i 76: T G G S R Q K V L V M E Y C S S G S L L S V L E S P E N A F G L P E D E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150  
 m i k k - i 76: T G G S R Q K V L I M E Y C S S G S L L S V L E D P E N T F G L S E E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150  
  
 h i k k - i 151: S I Y K L T D F G A A R E L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225  
 m i k k - i 151: S I Y K L S D F G A A R K L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225  
  
 h i k k - i 226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I A G A Q R R E N G P L E W S Y T L P I T C Q L S L G L Q S Q L V P I L A N I L E V E Q A K C W G F D Q F F A 300  
 m i k k - i 226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I S C T Q K Q E N G P L E W S Y S L P I T C R L S M G L Q N Q L V P I L A N I L E V E D E D K C W G F D Q F F A 300  
  
 h i k k - i 301: E T S D I L Q R V V H V F S L S Q A V L H H I Y I H A H N T I A I F Q E A V H K Q T S V A P R H Q E Y L F E G H L C V L E P S V S A Q H I A H T A 375  
 m i k k - i 301: E T S D I L Q R T V I H V F S L P Q A V L H H V Y I H A H N T I A I F L E A V Y E Q T N V T P K H Q E Y L F E G H P C V L E P S L S A Q H I A H T A A 375  
  
 h i k k - i 376: S S P L T L F S - T A - I P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y N T A K G V L G A G Y Q A L R L A R A L L D G Q E L M F R G L H W V M E 448  
 m i k k - i 376: S S P L T L F S M S S D T P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y S T A K G V L G A G Y Q A L W L A R V L L D G Q A L M L R G L H W V L E 450  
  
 h i k k - i 449: V L Q A T C R R T L E V A R T S L L Y L S S S L G T E R F S S V A G T P E I Q E L K A A A E L R S R L R T L A E V L S R C S Q N I T E T Q E S L S S L 523  
 m i k k - i 451: V L Q D T C Q Q T L E V T R T A L L Y L G S S L G T E R F S S G S G M P D V Q E R K E A T E L R T R L Q T L S E I L S K C S H N V T E T Q R S L S C L 525  
  
 h i k k - i 524: N R E L V R S R D Q V H E D - R S I Q Q I Q C C L D K M N F I Y K Q F K K S R M R P G L G Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 597  
 m i k k - i 526: G E E L L K N R D Q I H E D N K S I Q K I Q C C L D K M H F I Y K Q F K K S R M R P G L S Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 600  
  
 h i k k - i 598: Q K Y Q A S L V T H G K R M R V V H E T R N H L R E V C S V A A C N T E A Q G V Q E S L S K L L E E L S H Q L L Q D R A K G A Q A S P P I A P Y P 672  
 m i k k - i 601: Q T Y Q V S L V T H G K R M R Q V Q R A Q N H L H L I G H S V A T C N S E A R G A Q E S L N K I F D Q L - L L D R A S E Q G A E V S P Q P M A P H P 673  
  
 h i k k - i 673: S P T R K D L L L H M Q E L C E G M K L L A S D L L D N N R I I E R L N R V P A P D V 716  
 m i k k - i 674: G P D P K D L V F H M Q E L C N D M K L L A F D L Q D N N R L I E R L H R V P S A P D V 717

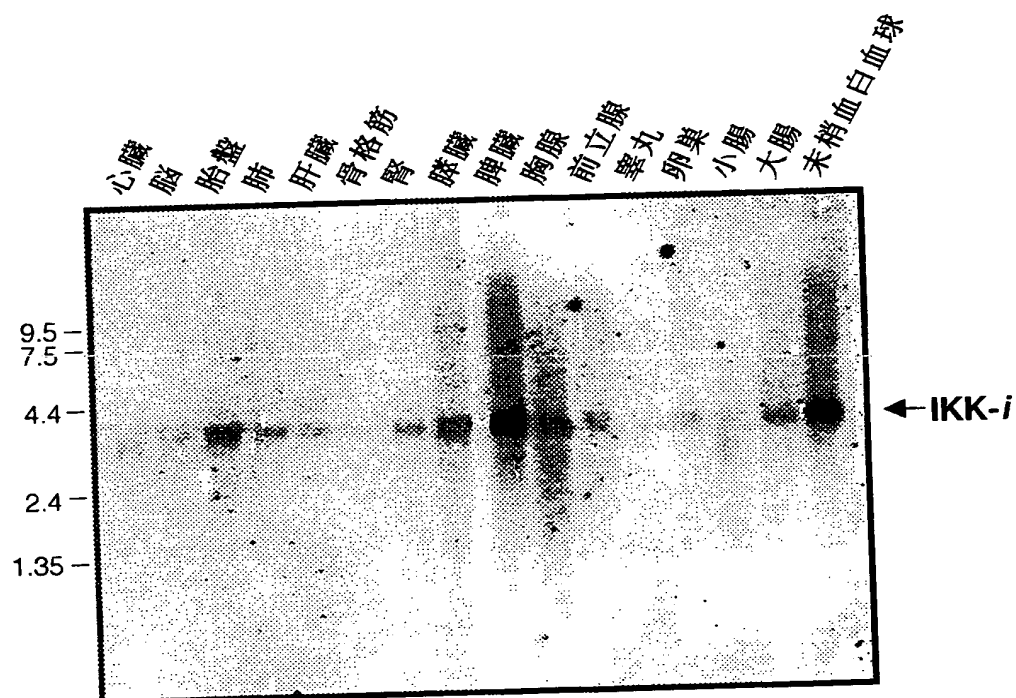




第 4 図

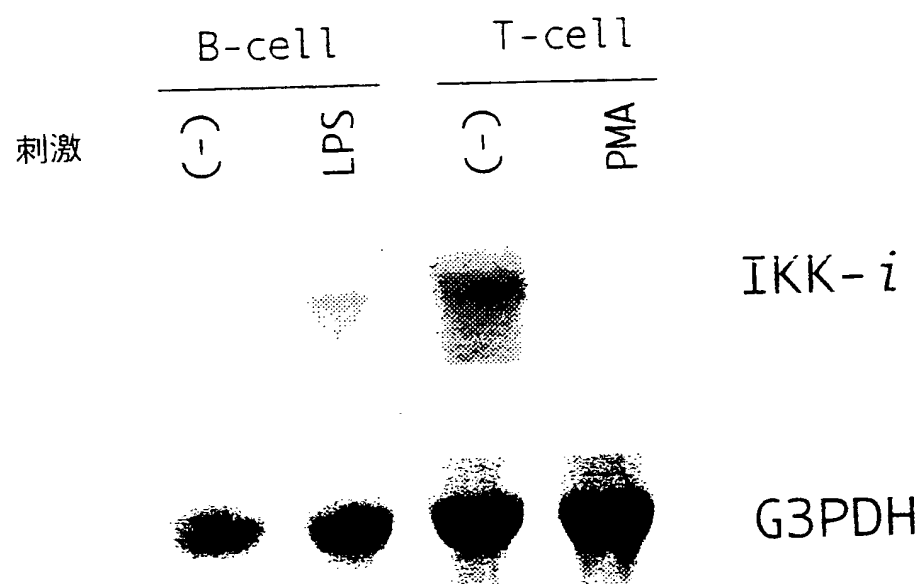
hikk-i 1 MOSTANVL-----WHTDDLHGQATASWYKARKKSGELVAVKVFNTTTSYLPRPREVQVREFEVLKXENHONIVKLFVAVENT-----GGSRQKVLVMEYCS 90  
 hikk-β 1 MSWSPSITQTCQWEMKEREGTQGNVIRWNOITCEQJATKQOQROELSPPNRNGLBQOMRRETHPNVMAARDVPEGMQNEAPNDLPILAMEYCO 100  
 hikk-α 1 MERPPGERPGAGGHWEMRERGTGGFQNNVCLYQHRELDLKIDAKSERLELSTKNRNRNGHEIQEMKENHANVWACBCEPEELNILI-HDVPLLAMEYCS 99  
 hikk-i 91 SGSLSVLESPEVAFGLPEDEFVVRVRCVAGMNHHERENGHVERDIKPGNIMRVGEGQSTYKLTDFGAKRPHDDDEKFFVSVVGVGHEYZHPDMYERAVL 190  
 hikk-β 101 GGDURKYLNOFENGQDREGAIVTSDISAALRPHENRPHRDKPENWY-LOQGEQRLTHKIDDLGVAKRELDQGSUGTSSEVETHQVIAPELLLE----- 195  
 hikk-α 100 GGDURKYLNOFENGQDREGAIVTSDISAALRPHENRPHRDKPENWY-LOQGEQRLTHKIDDLGVAKRELDQGSUGTSSEVETHQVIAPELLLE----- 194  
 hikk-i 191 RKPOOKAFGVTVDLMSIGVTLYHAAGSLPILH-----FGPBRNKEIMYRITTEKPAJALA-GAORRENGPLEMSVTLRITCOLSEGLQSOLVPILAN 283  
 hikk-β 196 ----OKYTVTVBYWBSFGTLAPGCTGTFKSNFENWQVQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGVWFSSEUPYNNINSVLAERLEKWQLQMLMWHPRQRT- 290  
 hikk-α 195 ----NKPYTATVBYWBSFGTMVFEELAGYKFTFHHLQFTTWHEKIKKDKPKCFACEEMSGEVRFFSHLPQPNSLCSLIVFEMENWLOUMLNWDFOQRRGP 290  
 hikk-i 284 I-LEVEQAKCWGFDQFFAETSDILQRVVHVVSQAVLHHIYIHAHNTAIFQEAHVHQTSAVRHQEYDFEGHLCVLEPSVSAQHIAHTTASSPLT-- 380  
 hikk-β 291 -DPRVGPNGC-----FKALDPDENKLVHLENVGTHTYTPVTEDESQSLKARIQODTGFPEEDQELIQEAGLAIIPDKPATQCTSDGKNEGHTLD 383  
 hikk-α 291 VDLTLKQPRG-----FVLMDEHNEKLVHLENVGTHTYTPVTEDESQSLKARIQODTGFPEEDQELIQEAGLAIIPDKPATQCTSDGKNEGHTLD 380  
 hikk-i 381 ----LES-----TAIPKGLAFRDPALDVPKFMKVDIQLADYNTAKGVLGAGYOALRLARA-----LLDQQLMFRGLHWV---MEVLOATCRRTLEVARTSL 465  
 hikk-β 384 MDLVFUDNSKITVETQISPRQPESVSCILQEPKANAFFQIRKNGQVHSHIQTEKEDCNREQQORAAAMNINRNNSCHSKMKNMSMASMSQQLKAKL 483  
 hikk-α 381 SYMVYEFKSKTVLEGPFASRSLSDCVNYTVQDSRIQFPIIQIRKWAEEAVHYVSGKEBYSRFFQGORAAAMLSILRYNANETKMKNTLISASQQLKAKL 480  
 hikk-i 466 LYLSSS--LGTRFSSVAGTPEIQELKAAAELRSRLRTLAEVLRSQSN--ITETQESLSLNRELVKSRDVHEDRSIQIQCCLDKMNFIYKQFK-KS 560  
 hikk-β 484 DFFKTSIQIDHEKYSQTEF----GHTDGLLAW-REMEQAVELEGRENEVKLIVERMMALOTDIDVQSRPVKQGGTLDLDEOARELYRRLREKP 578  
 hikk-α 481 EFFHKSTQLDLERYSEQNTY----GTSSEKMKAW-KEMEKAHYAEVGVIGYLEQIMSEHAETMEQKSPYGRROGDLMESLEQRAIDLYKQKHRP 575  
 hikk-i 592 RMRPGLGYNEEQIH-----KLDKYNFSSHAK-----RLQVFOEECVQKYOASLVTHGKRMRVVHETRN-----HLRLVGCSSVAACNTEAQGVQE 640  
 hikk-β 579 RDORTEGDSOEWRLLQAIQSEKKVRVIVTQSKTVVCKOKABERPK--VEEVVSLMNEDEKTVVRLQERHOKELMNLKTAGSK-----VRG 667  
 hikk-α 576 SDH-SYSDSTEMVKIIVHTVQSDRVLKELFCHESKLLGCKOKIIDLBPK--VEVALSNIKEADNTVMFMQCKRQKBIWHLEKIACTOSSARSL-----VGS 669  
 hikk-i 641 SLSKLLEELS HQLQDRAKGAQASPPPIAPYSSTRK--DULLHMQELGEGM--KLLASDLLNNRIIERENRVAPPD-----V 716  
 hikk-β 668 PVSGSPDSMNASRIQSPGOLMSQSTANSLREPAKSEETVAEHNDC-TLLENATQDTRVREGDSFTAIDWSWLOTEEEHSCLEQAS 756  
 hikk-α 670 SLEGAVTPQTSAWLEP-FTSAEHDHSLSCVVTPODGETSAQMIENLN-CLGHLSITIIHEANEEOGNSMMNLDWSWJ-----TE 745





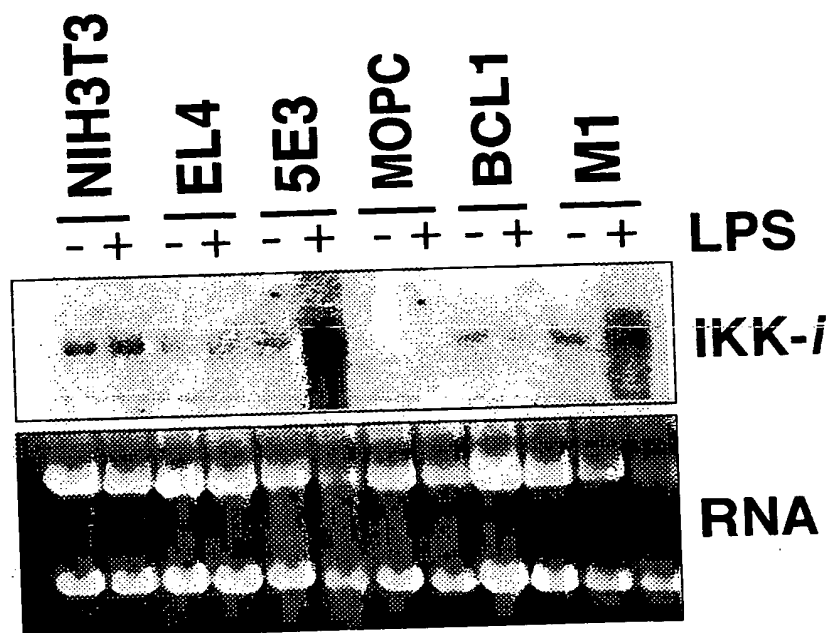


## 第 6 図



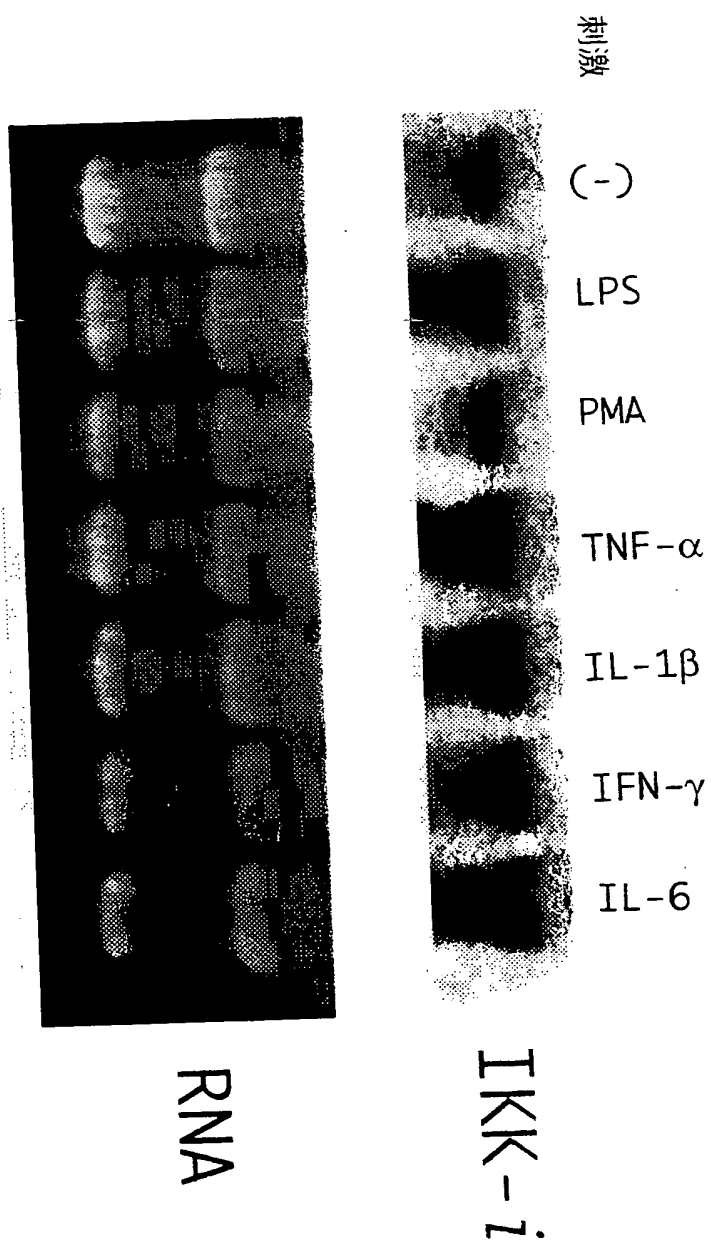


第 7 図



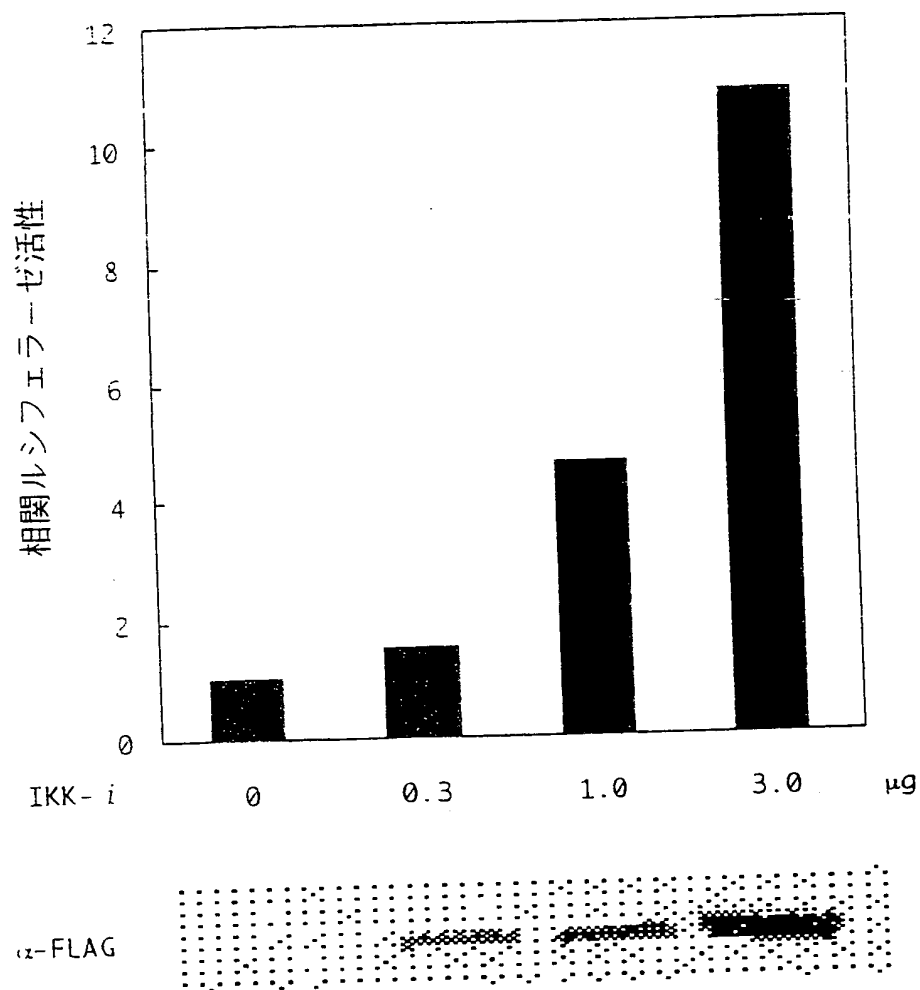




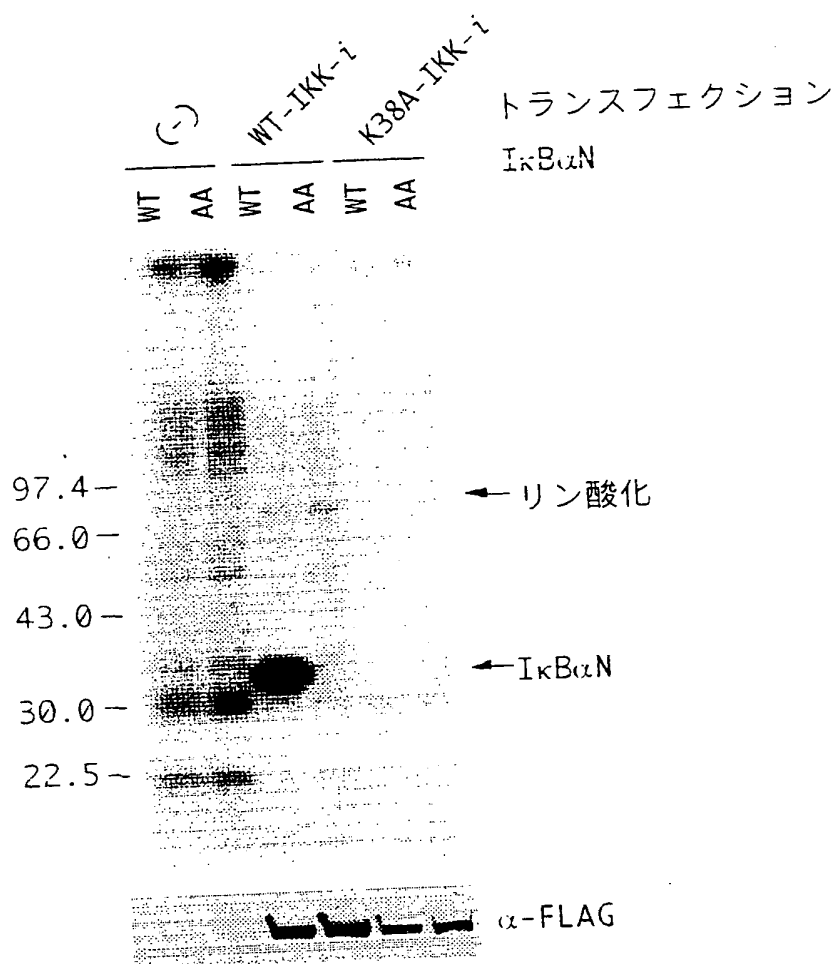




## 第 9 図

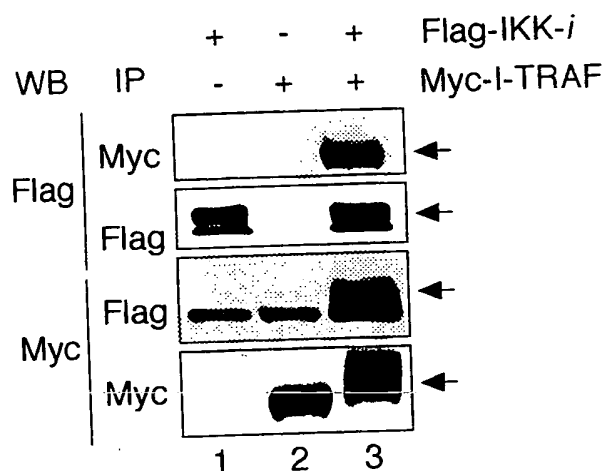
IKK- $\alpha$  の NF- $\kappa$ B 活性化能の発現



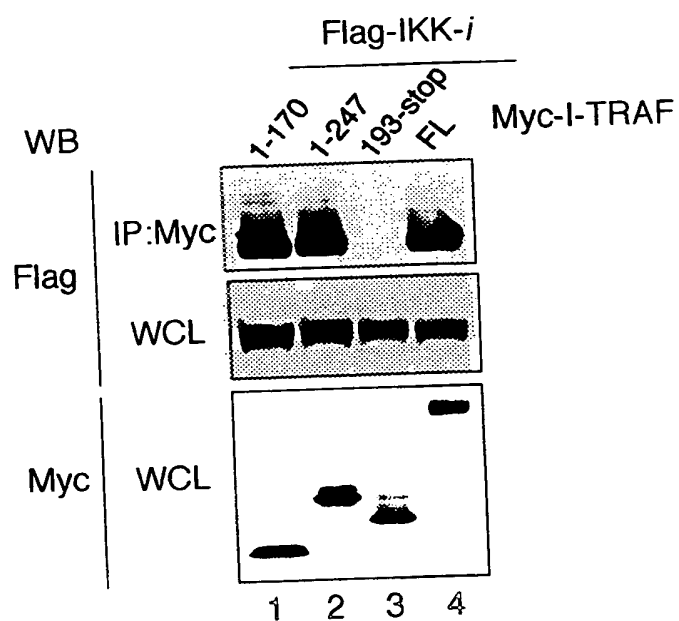


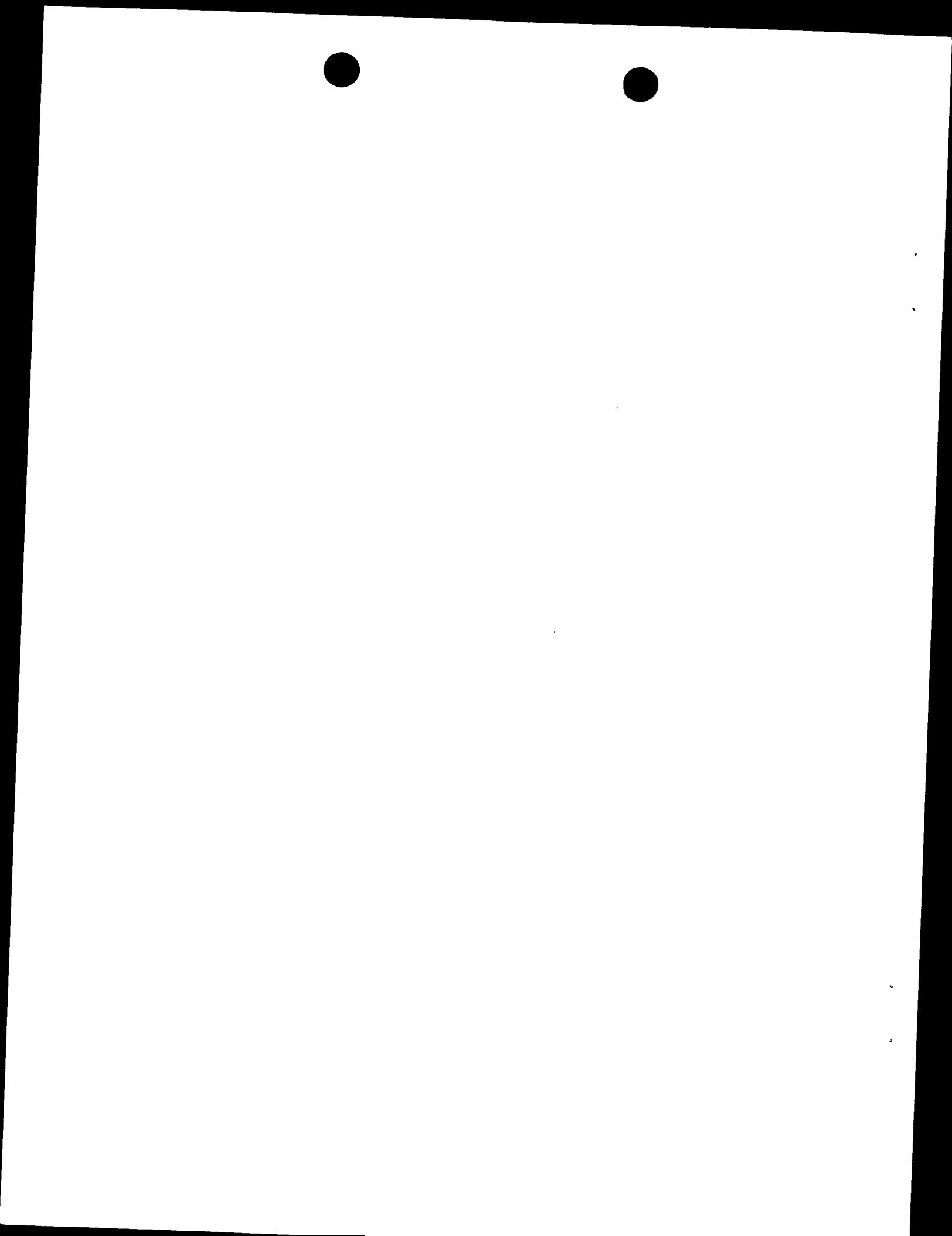


第 1 1 図



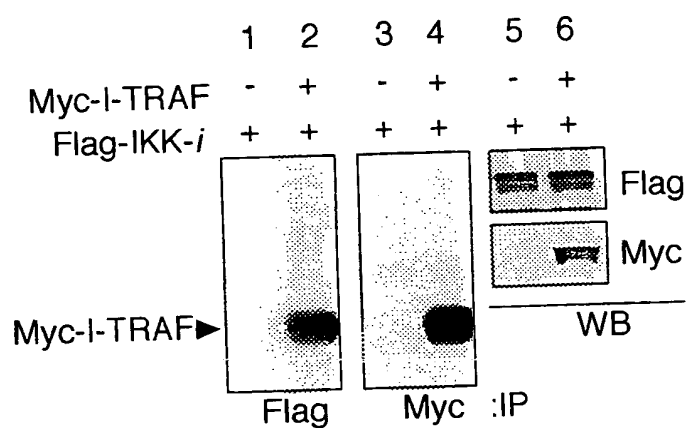
第 1 2 図



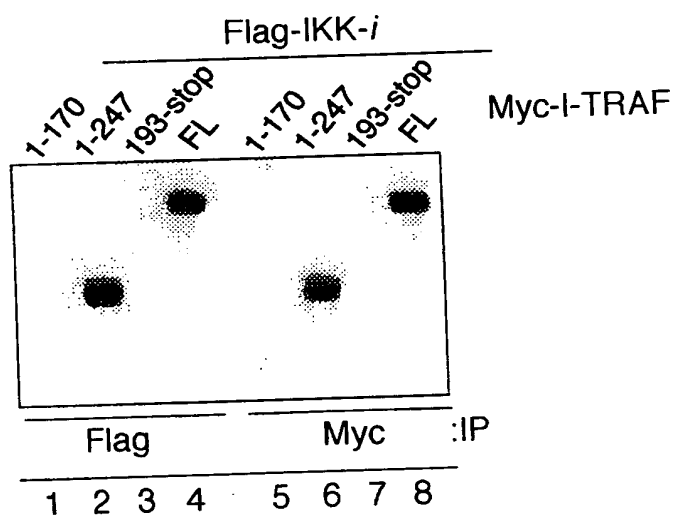




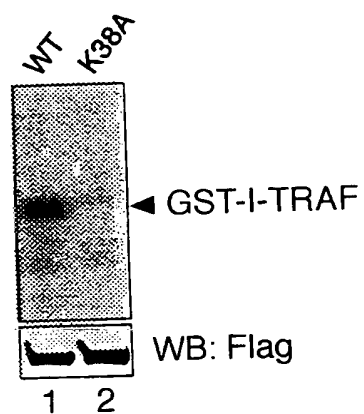
第 13 図



第 14 図









## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Identification of Novel Substrate I-TRAF of IKK-i Kinase

<130> JA901491

<160> 4

<210> 1

<211> 2154

<212> DNA

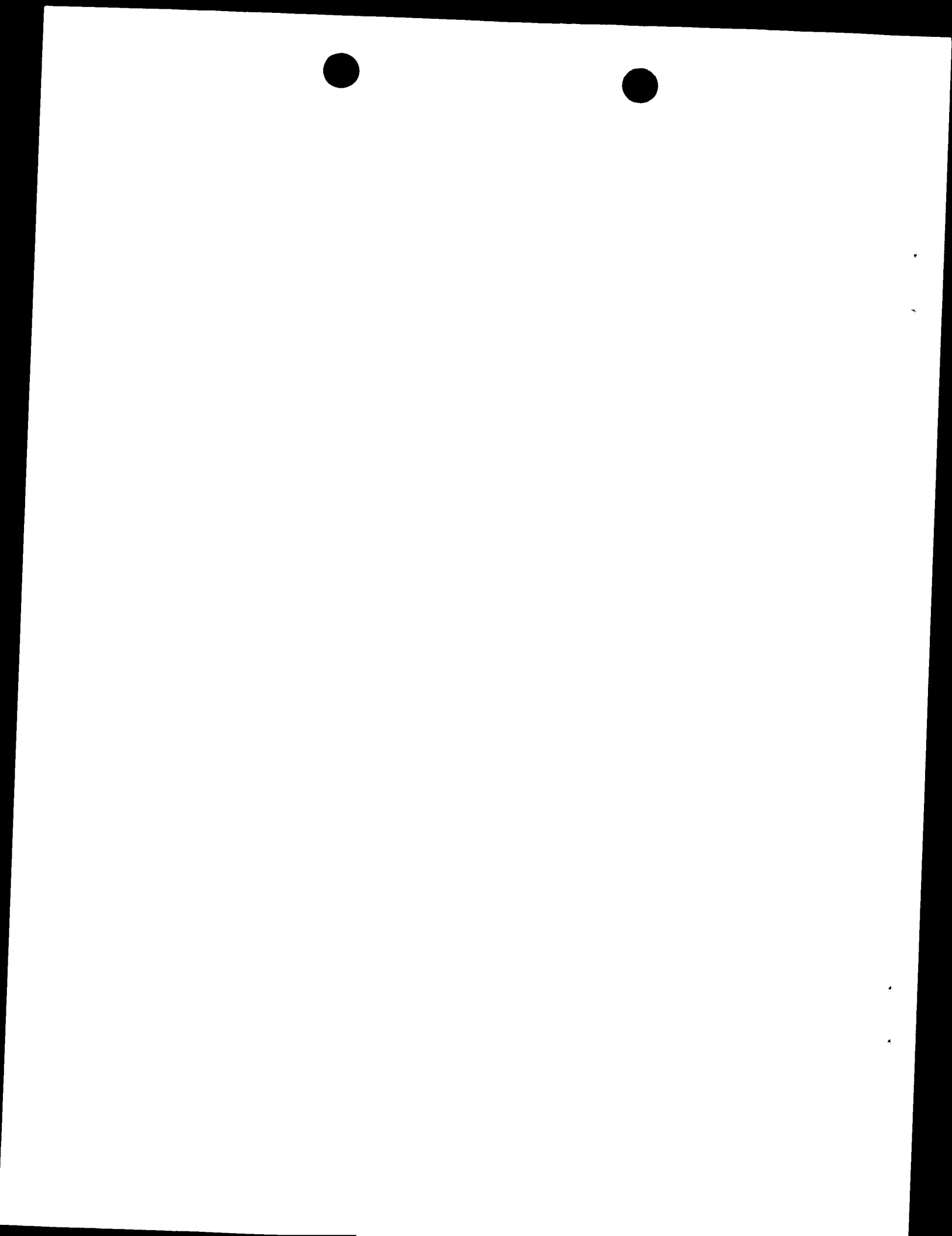
<213> Human

<400> 1

```

agatgcagag cacagccaat tacctgtggc acacagatga cctgctgggg cagggggcca      60
ctgccagtgt gtacaaggcc cgcaacaaga aatccggaga gctggttgct gtgaaggtct      120
tcaacactac cagctacctg cggccccgcg aggtgcaggt gagggagttt gaggtcctgc      180
ggaagctgaa ccaccagaac atcgtcaagc tctttgcggt ggaggagacg ggcggaagcc      240
ggcagaaggt actggtgatg gagtactgct ccagtgggag cctgctgagt gtgctggaga      300
gccctgagaa tgcctttggg ctgcctgagg atgagttcct ggtggtgctg cgctgtgtgg      360
tggccggcat gaaccacctg cgggagaacg gcattgtgca tcgcgacatc aagccgggga      420
acatcatgcg cctcgtaggg gaggaggggc agagcatcia caagctgaca gacttcggcg      480
ctgcccggga gctggatgat gatgagaagt tcgtctcggt ctatgggact gaggagtacc      540
tgcatccga catgtatgag cgggcgggtgc ttcgaaagcc ccagcaaaaa gcgttcgggg      600
tgactgtgga tctctggagc attggagtga ccttgtacca tgcagccact ggcagcctgc      660
ccttcacccc ctttggtggg ccacggcgga acaaggagat catgtaccgg atcaccacag      720

```



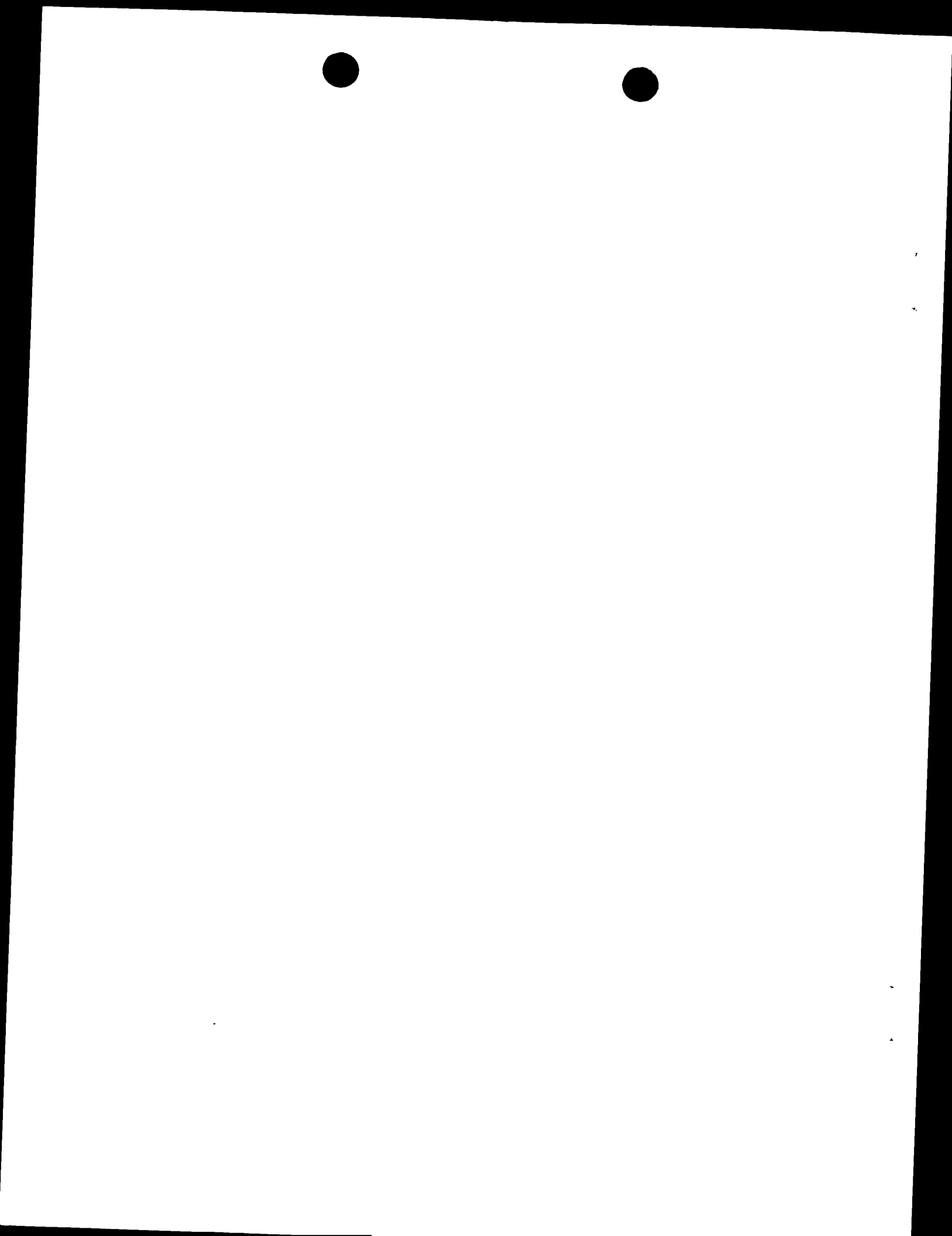
agaagccggc tggggccatt gcaggtgccc agaggcggga gaacggggccc ctggagtgga 780  
 gctacacct ccccatcacc tgccagctgt cactggggct gcagagccag ctggtgccc 840  
 tcctggccaa catcctggag gtggagcagg ccaagtgtg gggcttcgac cagttctttg 900  
 cggagaccag tgacatctg cagcgagttg tcgtccatgt cttctccctg tcccaggcag 960  
 tcctgcacca catctatata catgcccaca acacgatagc cattttccag gaggccgtgc 1020  
 acaagcagac cagtgtggcc ccccgacacc aggagtacct ctttgagggt cacctctgtg 1080  
 tcctcgagcc cagcgtctca gcacagcaca tcgcccacac gacggcaagc agccccctga 1140  
 ccctcttcag cacagccatc cctaaggggc tggccttcag ggacctgtct ctggacgtcc 1200  
 ccaagttcgt ccccaaagtg gacctgcagg cggattacaa cactgccaag ggcgtgttgg 1260  
 gcgcccggta ccaggccctg cggctggcac gggccctgtct ggatgggcag gagctaattg 1320  
 ttggggggct gcactgggtc atggaggtgc tccaggccac atgcagacgg actctggaag 1380  
 tggaaggac atccctctc tacctcagca gcagcctggg aactgagagg ttcagcagcg 1440  
 tggctggaac gcctgagatc caggaactga aggcggctgc agaactgagg tccaggctgc 1500  
 ggactctagc ggaggtcctc tccagatgct cccaaaatat cacggagacc caggagagcc 1560  
 tgagcagcct gaaccgggag ctggtgaaga gccgggatca ggtacatgag gacagaagca 1620  
 tccagcagat tcagtgtgt ttggacaaga tgaacttcat ctacaaacag ttcaagaagt 1680  
 ctaggatgag gccagggtt ggctacaacg aggagcagat tcacaagctg gataaggtga 1740  
 atttcagtca tttagccaaa agactcctgc aggtgttcca ggaggagtgc gtgcagaagt 1800  
 atcaagcgtc cttagtcaca cacggcaaga ggatgagggt ggtgcacgag accaggaacc 1860  
 acctgcgcct ggttggctgt tctgtggctg cctgtaacac agaagcccag ggggtccagg 1920  
 agagtctcag caagctcctg gaagagctat ctcaccagct ccttcaggac cgagcaaagg 1980  
 gggctcaggc ctgcgcgcct cccatagctc cttaccccag ccctacacga aaggacctgc 2040  
 ttctccacat gcaagagctc tgcgagggga tgaagctgtt ggcatctgac ctctggaca 2100  
 acaaccgcat catcgaacgg ctaaataagag tcccagcacc tcctgatgtc tgag 2154

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 716

&lt;212&gt; PRT

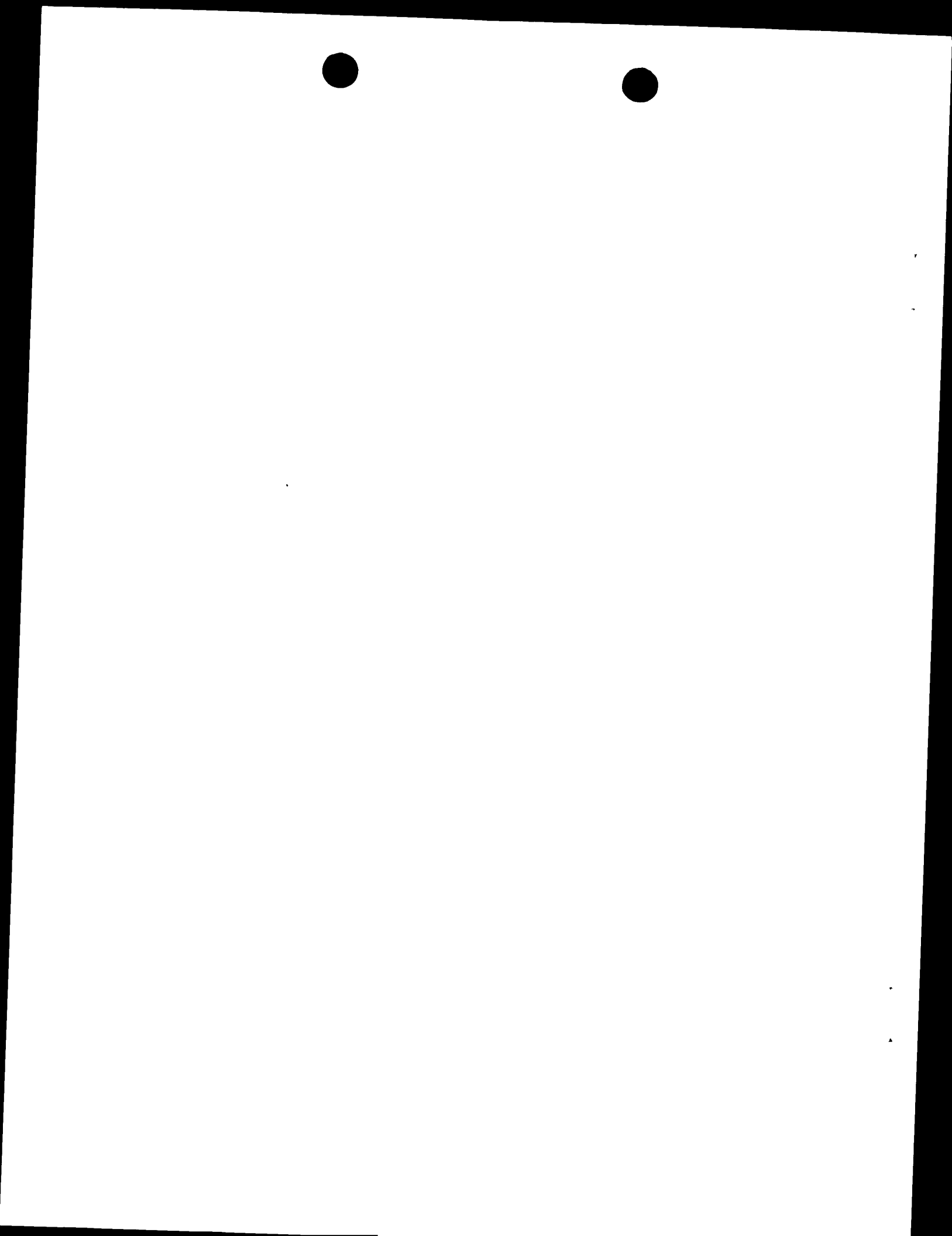
&lt;213&gt; Human





&lt;400&gt; 2

Met Gln Ser Thr Ala Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Leu Val Ala Val Lys Val Phe Asn Thr Thr Ser Tyr	45
Leu Arg Pro Arg Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Lys Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Val Met Glu Tyr Cys Ser	90
Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Ser Pro Glu Asn Ala Phe	105
Gly Leu Pro Glu Asp Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Thr Asp Phe Gly Ala Ala Arg Glu Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gln Arg Arg Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Thr Cys Gln Leu Ser	270
Leu Gly Leu Gln Ser Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Gln Ala Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Val Val Val His Val Phe Ser	315
Leu Ser Gln Ala Val Leu His His Ile Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Gln Glu Ala Val His Lys Gln Thr Ser Val	345
Ala Pro Arg His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Leu Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Val Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Thr Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Thr Ala Ile Pro Lys Gly Leu	390
Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val Pro Lys	405
Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Asn Thr Ala Lys Gly Val Leu Gly	420



Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Arg Leu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Gly	435
Gln Glu Leu Met Phe Arg Gly Leu His Trp Val Met Glu Val Leu	450
Gln Ala Thr Cys Arg Arg Thr Leu Glu Val Ala Arg Thr Ser Leu	465
Leu Tyr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser Ser Val	480
Ala Gly Thr Pro Glu Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Ala Glu Leu	495
Arg Ser Arg Leu Arg Thr Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser	510
Gln Asn Ile Thr Glu Thr Gln Glu Ser Leu Ser Ser Leu Asn Arg	525
Glu Leu Val Lys Ser Arg Asp Gln Val His Glu Asp Arg Ser Ile	540
Gln Gln Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met Asn Phe Ile Tyr Lys	555
Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Gly Tyr Asn Glu	570
Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser His Leu Ala	585
Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val Gln Lys Tyr	600
Gln Ala Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg Val Val His	615
Glu Thr Arg Asn His Leu Arg Leu Val Gly Cys Ser Val Ala Ala	630
Cys Asn Thr Glu Ala Gln Gly Val Gln Glu Ser Leu Ser Lys Leu	645
Leu Glu Glu Leu Ser His Gln Leu Leu Gln Asp Arg Ala Lys Gly	660
Ala Gln Ala Ser Pro Pro Pro Ile Ala Pro Tyr Pro Ser Pro Thr	675
Arg Lys Asp Leu Leu Leu His Met Gln Glu Leu Cys Glu Gly Met	690
Lys Leu Leu Ala Ser Asp Leu Leu Asp Asn Asn Arg Ile Ile Glu	705
Arg Leu Asn Arg Val Pro Ala Pro Pro Asp Val ***	716

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2910

&lt;212&gt; DNA

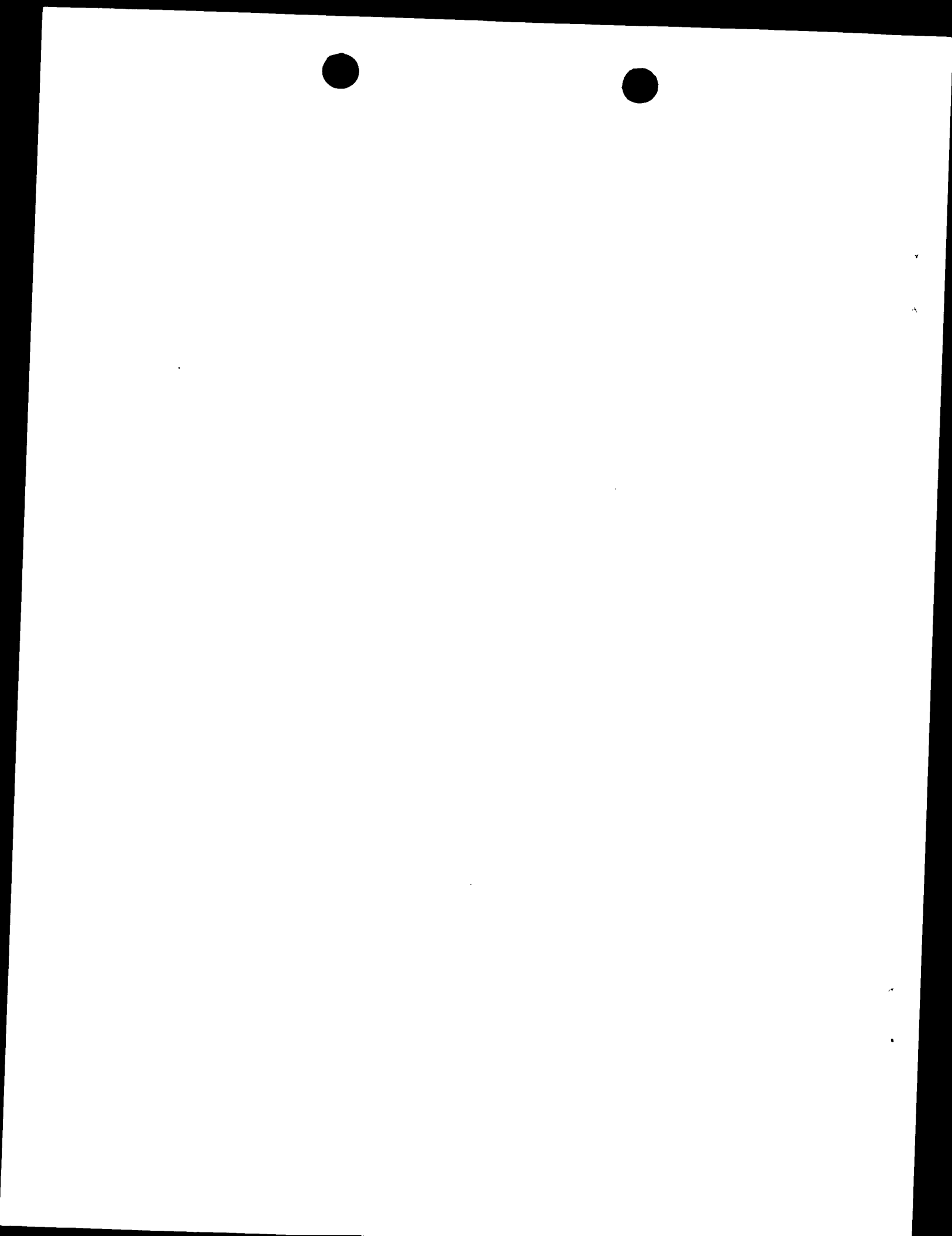
&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 3

gaattcggca cgagaagata gccaaagccca ggagatgcag agtaccacta actacctgtg	60
gcatactgat gacctgctag ggcagggggc cactgccagt gtgtacaagg cccgaaacaa	120
gaaatccggg gaggtggttg ctgtaaaggt cttcaactca gccagctatc ggcgacctcc	180



tgaggttcag gtgagggagt ttgaggtcct gcgaggctg aatcaccaga acatcgtgaa 240  
gctattcgca gtggaggaaa cgggaggcag ccggcagaag gtgctaata tggagtactg 300  
ctccagtggg agcctgctga gcgtgctgga agaccctgag aacacgttcg ggctttctga 360  
agaggagtgc ctagtggtgc tgcgctgtgt ggtggctggc atgaaccacc tgcgggagaa 420  
tggcattgtc catcgggaca tcaaacctgg gaacatcatg cgcctgggtg gcgaggaggg 480  
gcagagcatc tataagctgt ctgacttcgg ggctgcccgc aagctggacg atgatgagaa 540  
gtttgtttct gtctatggta cagaggaata cctgcaccct gacatgtatg agcgtgcagt 600  
gctgcgcaaa ccccagcaaa aggcatattg tgtgactgtg gatctctgga gtattggggg 660  
gacctgtac cagcgagcca caggcagtct gcccttcac cccttcgggtg ggccccggcg 720  
caacaaagag atcatgtaca gaatcaccac agagaagcca gccggggcca tttcaggagc 780  
tcagaagcag gaaaatggtc ccttggagtg gagctacagc ctccccatca cctgtagact 840  
gtccatgggg ctgcagaacc agctgggtgcc catcctggcc aacatcctgg aggtggaaga 900  
ggataagtgc tggggctttg atcagttctt cgcggagacc agtgacattc tgcagcgaac 960  
ggtcacccac gtcttttccc taccacaggc cgttttgcat catgtctaca tccacgccc 1020  
caacacgatt gccatctttt tggaggtgtg atatgagcag accaacgtga ccccaaaaca 1080  
ccaggagtac ctcttcgagg gtcacccttg tgtccttgag ccaagcctct cagcccagca 1140  
catgcccac acagctgccg gcagccctct aactctgttc agcatgtcca gcgacacacc 1200  
taaggggctg gccttcaggg accctgctct ggatgtccca aagttcgtcc ctaaggttga 1260  
cctacaggcc gattacagca cagctaaggg ggtgctgggc gctggctacc aggccctgtg 1320  
gctggcgcg gtcctgctgg atggacaggc gttgatgctt cgggggttac attgggtcct 1380  
ggaggtgctt caggacacgt gccagcagac actggaggtc acacggacag ccctcctcta 1440  
cctcggcagc agcctgggca ctgaaagggt cagcagtgga tcggggatgc ctgacgtcca 1500  
ggaacgaaag gaggccacag agctaagaac caggctgcag actctctcag agatcctgtc 1560  
taaagtgtcc cacaatgtca cagaaacca aaggagcctg agctgtctgg gtgaagagct 1620  
tttaagaac cgggaccaga ttcattgagga taacaaaagt atccagaaga ttcagtgttg 1680  
tttgacaag atgcacttca tctacaaaca gttcaagaaa tccaggatga ggccagggtc 1740  
cagctacaat gaggagcaga tccacaagct ggataaggta aatttcagtc atctagccaa 1800  
gaggctgctg cagggtgtcc aggaggagtg tgtgcagacg tatcagggtg cgctggtcac 1860  
acacggcaag cggatgaggc aggtgcagag ggcccagaac cacctgcac tcattggcca 1920



ctctgtggcc acctgtaact cggaagcccg gggagcccag gagagtctga acaagatctt 1980  
 tgatcagctc cttctggaca gagcttccga acaggagagct gaggtgtcac cgcaacctat 2040  
 ggctcctcat cccggccctg atccgaagga cctgggtcttc cacatgcagg agctttgtaa 2100  
 tgatatgaag ctattggcct ttgatctcca ggacaacaac cgactcatcg aacggttaca 2160  
 tagagttcca tgggcaccag atgtctgagc tccctggggg ttcacaaggc actcagaagc 2220  
 aatagaaaca ttcataattgt acccctacac tgtgagacca aattcagggc aagttctggt 2280  
 tccatctcac tagcctacct cctcttggc cattggccat tggccaacaa actagcatta 2340  
 ctttgactgt cctcttggga agcagctagg acagggactc ctggccatcc caggcagtat 2400  
 ctacagaaga gaccatggg ctaccacagc cttatcaaga caccaagact gttcttctt 2460  
 acccaggctc tggagggtctg gtcttggaaa gaaaaggctc agccctctca cgctttgcac 2520  
 ttcccaggac cagcaggcat ctctgtggc ttctctgccc tctccagggt gctggatcag 2580  
 aatgcttatt cttegttgtt tcctgtgctg tttctgagt gtcccatcc cctggcctca 2640  
 ggcaaccac aaacggcccc tctgtgcttg gtctagatgc acctgcattt gagaaagtgg 2700  
 gtggttgagg ctaactgctg gtgctttgag gattctcctt gaccttttct ccgaggaacg 2760  
 cttggttcta agaaacagct ggtcagtatc aaccacagcc atgctaactg gacagatgtt 2820  
 ggaacccaaa gtcttaagga gagagcaggc ctgcaccttc agacatggaa taaatacatc 2880  
 gccttttctg tttaaaaaaa aaaaaaaaaa 2910

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 717

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

Met Gln Ser Thr Thr Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu 15  
 Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys 30  
 Ser Gly Glu Val Val Ala Val Lys Val Phe Asn Ser Ala Ser Tyr 45  
 Arg Arg Pro Pro Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg 60  
 Arg Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu 75  
 Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Ile Met Glu Tyr Cys Ser 90  
 Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Asp Pro Glu Asn Thr Phe 105





Gly Leu Ser Glu Glu Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Ser Asp Phe Gly Ala Ala Arg Lys Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ser Gly Thr Gln Lys Gln Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Ser Leu Pro Ile Thr Cys Arg Leu Ser	270
Met Gly Leu Gln Asn Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Thr Val Ile His Val Phe Ser	315
Leu Pro Gln Ala Val Leu His His Val Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Leu Glu Ala Val Tyr Glu Gln Thr Asn Val	345
Thr Pro Lys His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Pro Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Leu Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Ala Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Met Ser Ser Asp Thr Pro Lys	390
Gly Leu Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val	405
Pro Lys Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Ser Thr Ala Lys Gly Val	420
Leu Gly Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Trp Leu Ala Arg Val Leu Leu	435
Asp Gly Gln Ala Leu Met Leu Arg Gly Leu His Trp Val Leu Glu	450
Val Leu Gln Asp Thr Cys Gln Gln Thr Leu Glu Val Thr Arg Thr	465
Ala Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser	480
Ser Gly Ser Gly Met Pro Asp Val Gln Glu Arg Lys Glu Ala Thr	495
Glu Leu Arg Thr Arg Leu Gln Thr Leu Ser Glu Ile Leu Ser Lys	510
Cys Ser His Asn Val Thr Glu Thr Gln Arg Ser Leu Ser Cys Leu	525
Gly Glu Glu Leu Leu Lys Asn Arg Asp Gln Ile His Glu Asp Asn	540



Lys Ser Ile Gln Lys Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met His Phe	555
Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Ser	570
Tyr Asn Glu Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser	585
His Leu Ala Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val	600
Gln Thr Tyr Gln Val Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg	615
Gln Val Gln Arg Ala Gln Asn His Leu His Leu Ile Gly His Ser	630
Val Ala Thr Cys Asn Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gln Glu Ser Leu	645
Asn Lys Ile Phe Asp Gln Leu Leu Leu Asp Arg Ala Ser Glu Gln	660
Gly Ala Glu Val Ser Pro Gln Pro Met Ala Pro His Pro Gly Pro	675
Asp Pro Lys Asp Leu Val Phe His Met Gln Glu Leu Cys Asn Asp	690
Met Lys Leu Leu Ala Phe Asp Leu Gln Asp Asn Asn Arg Leu Ile	705
Glu Arg Leu His Arg Val Pro Ser Ala Pro Asp Val ***	717



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/GenBank/EMBL/DDBJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Database BIOSIS on DIALOG, BIOSIS No.19900377627, Shimada T., et al., "IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases", abstract, (International Immunology (1999.Aug), Vol. 11, No. 8, pages 1357-1362)	1-8
A	Nagase T., et al., "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes", DNA Res.(1995), Vol. 2, pages 167-174, Table 1, 3, KIAA0151 "Gene"	1-8
A	US, 5776717, A (Tularik Inc.), 07 July, 1998 (07.07.98), Claim 1, 15-18 & WO, 98/39410, A	1-8
A	Ebrahim Z., et al., "The IκB kinase complex(IKK) contains two kinase subunits, IKKα and IKKβ, necessary for IκB phosphorylation and NF-κB activation", Cell (1997), Vol. 91, No. 2, Pages 243-252	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 December, 1999 (07.12.99)

Date of mailing of the international search report  
14 December, 1999 (14.12.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05916

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Joseph A., et al., "A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B", Nature (1997), Vol. 288, No. 6642, pages 548-554	1-8
A	Frank Mercurio et al., "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation", Science (1997), Vol. 278, pages 860-866	1-8
A	John D., et al., "I $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ and NIK", Science (1997), Vol. 278, pages 866-8869	1-8
A	Catherine H., et al., "Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase", Cell (1997), Vol. 90, No. 2, Pages 373-383	1-8

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05916

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/GenBank/EMBL/DBJ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Database BIOSIS on DIALOG, BIOSIS No. 19900377627, Shimada T., et al. "IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases", abstract, (International Immunology(1999. Aug), Vol. 11, No. 8, p. 1357-1362)	1-8
A	Nagase T., et al. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes", DNA Res. (1995), Vol. 2, p. 167-174, Table 1及び3のKIAA0151遺伝子参照	1-8
A	US, 5776717, A (Tularik Inc.) 7.7月. 1998 (07.07.98) 請求項1及び第15-18欄参照 & WO, 98/39410, A.	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.99

国際調査報告の発送日

14.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ebrahim Z., et al. "The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$ and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation", Cell(1997), Vol. 91, No. 2, P. 243-252	1-8
A	Joseph A., et al. "A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B", Nature(1997), Vol. 288, No. 6642, p. 548-554	1-8
A	Frank Mercurio et al. "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation", Science(1997), Vol. 278, p. 860-866	1-8
A	John D., et al. "I $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ and NIK", Science(1997), Vol. 278, p. 866-8869	1-8
A	Catherine H., et al. "Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase", Cell(1997), Vol. 90, No. 2, P. 373-383	1-8